



Casa abierta al tiempo

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

**Estudios sobre Regulación Epigenética del  
Metabolismo Secundario en *Penicillium  
chrysogenum***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**Maestra en Ciencias**

CON ESPECIALIDAD EN:  
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

**Lady Vanessa Polania Osorio**

Director:

Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesores:

Dr. Francisco José      Dra. María Salud  
Fernández Perrino      Pérez Gutiérrez

División de Ciencias Biológicas y de la salud.  
Unidad Iztapalapa  
Julio de 2016



---

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Mejoramiento Genético de Microorganismos Industriales del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Francisco Fierro Fierro. Se contó con el apoyo de CONACyT, con el otorgamiento de la beca para estudios de posgrado No. 284110.



---

Ciudad de México a 8 de Julio de 2016

El jurado designado por  
la Division de Ciencias Biologicas y de la Salud de la unidad Iztapalapa  
aprobó la tesis

**“Estudios sobre Regulacion Epigenetica del Metabolismo  
Secundario en *Penicillium Chrysogenum*”**

que presentó

**Lady Vanessa Polania Osorio**

**Comité tutorial:**

Director: Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

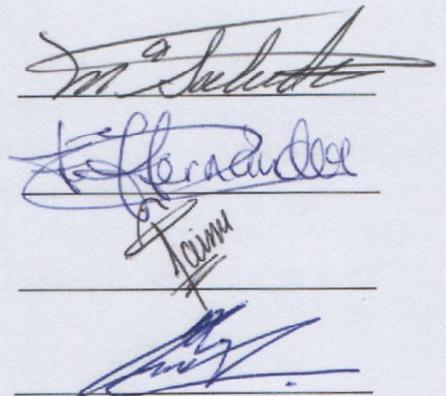
**Jurado:**

Presidente: Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Secretario: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Vocal: Dr. Jaime Marcial Quino

Vocal: M. en C. Ulises Carrasco Navarro





# Agradecimientos

---

Quiero agradecer a mis queridos padres Trinidad y Hugo, y a mi hermano Jonathan por su confianza, motivación, comprensión e incondicional apoyo que siempre me han dado para alcanzar mis objetivos, aún cuando esto ha significado estar en la distancia.

A la familia Bermúdez, agradezco especialmente a Eulalia y Salvador porque desde que llegue a este país me han brindado todo el apoyo, colaboración y cariño durante estos años.

De igual manera al director de mi tesis el Dr. Francisco Fierro, por permitirme ser parte de su línea de investigación, por su conocimiento, por su paciencia y orientación para el desarrollo y finalización de este trabajo de maestría.

Así también a mis compañeros de Laboratorio quienes fueron de valiosa ayuda y compañía durante la realización de este trabajo, agradezco sus consejos y el tiempo que compartimos.

A los miembros del jurado el Dr. Francisco José Fernández Perrino, la Dra. María Salud Pérez Gutiérrez, al Dr. Jaime Marcial Quino y al M. en C. Ulises Carrasco Navarro por sus contribuciones realizadas al trabajo final y por el tiempo dedicado.

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico durante la realización de parte de este proyecto.



# Resumen

---

Los hongos filamentosos tienen un gran potencial para producir moléculas bioactivas, muchas de ellas de interés para la industria farmacéutica, como por ejemplo antibióticos y antitumorales. Por ello resulta de gran interés la búsqueda de *clusters* del metabolismo secundario que sinteticen nuevos productos naturales. Sin embargo, frecuentemente estos *clusters* no se expresan en las condiciones habituales de cultivo en laboratorio, y en consecuencia no se sintetizan los compuestos a los que darían lugar. Estos *clusters* que no se expresan habitualmente se denominan “*clusters* silentes”, y los compuestos que sintetizan suelen denominarse “*crípticos*”. El silenciamiento de *clusters* del metabolismo secundario se sabe que depende principalmente de mecanismos de regulación epigenética.

Se conoce como Minería Genómica (*Genome Mining*) a la búsqueda de nuevas enzimas y productos a partir de la información suministrada por la secuencia de un genoma. En el campo del metabolismo secundario comprende un conjunto de estrategias encaminadas a la búsqueda de nuevos *clusters*, su expresión y la obtención de nuevos metabolitos secundarios. El objetivo de este estudio fue emplear algunas estrategias de Minería Genómica para la manipulación de la regulación epigenética en *P. chrysogenum* NRRL 1951, y provocar cambios en el perfil de metabolitos secundarios producidos. De igual forma, se realizó un análisis para la predicción de *clusters* involucrados en el metabolismo secundario mediante el análisis del genoma del hongo utilizando el programa bioinformático antiSMASH.

Una parte de este trabajo consistió en la aplicación de distintas concentraciones de dos compuestos remodeladores de la cromatina: 5-azacitidina (inhibidor de DNA metiltransferasas) y tricostatina A (inhibidor de histonas desacetilasas), a medios de cultivo líquidos de *P. chrysogenum*. Uno de los medios utilizados fue el medio definido



---

MDFP y otro el medio complejo PDB. A continuación los extractos obtenidos se analizaron por LC-MS, y los perfiles cromatográficos generados fueron examinados con el programa MZmine2, que permitió evidenciar la aparición de cambios en el perfil de metabolitos secundarios en todas las condiciones utilizadas. Se produjeron cambios de manera más significativa en el medio PDB con la concentración de 250  $\mu\text{M}$  de 5-azacitidina y 1  $\mu\text{M}$  de tricostatina A.

Se utilizaron además técnicas moleculares para modificar la regulación epigenética. Se construyó un vector para el silenciamiento por medio de la vía RNAi (RNA inter-ferente) del gen *cclA*, cuyo producto hace parte del complejo COMPASS, un efector transcripcional que actúa favoreciendo el estado de heterocromatina. Con este vector de silenciamiento se obtuvieron ocho cepas transformantes de *P. chrysogenum*, que fueron analizadas mediante PCR para confirmar la integración del vector.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis con el software bioinformático antiSMASH de la secuencia genómica de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, con el objeto de predecir *clusters* del metabolismo secundario, dando como resultando un aumento considerable en el número y clase de compuestos predichos en comparación con un estudio previamente realizado en este hongo con otro programa.

En resumen, en el presente estudio se pusieron a punto varias estrategias complementarias con el propósito de encontrar nuevos compuestos bioactivos producidos por *P. chrysogenum*.



# Abstract

---

Filamentous fungi have a great potential to produce bioactive molecules, many of them of interest to the pharmaceutical industry, such as antibiotics and antitumor agents. It is therefore of great interest to search for clusters of secondary metabolism to synthesize new natural products. However, often these clusters are not expressed under conditions of cultivation in the laboratory, and consequently the compounds that these clusters might produce are not synthesized. Clusters that are not expressed are known as “silent clusters”, and the compounds that they potentially may synthesize are usually called “cryptic”. The silencing of secondary metabolism clusters is known that depends mainly on epigenetic regulatory mechanisms.

The concept of Genome Mining refers to the search of new enzymes and products on the basis of the information provided by the sequence of a genome. In the field of secondary metabolism genome mining comprises a set of strategies for the search of new biosynthetic clusters, their expression and the isolation and identification of new secondary metabolites. The objective of this study was to assay some genome mining strategies for the manipulation of the epigenetic regulation in *P. chrysogenum* NRRL 1951, and thus cause changes in the profile of the secondary metabolites produced. Similarly, a bioinformatic analysis was carried out for the prediction of clusters involved in secondary metabolism through the analysis of the *P. chrysogenum* genome using the program antiSMASH.

A part of this work was the application of different concentrations of two chromatin remodeling compounds: 5-azacitidine (DNA methyltransferase inhibitor) and trichostatin A (histone deacetylase inhibitor), to liquid cultures of *P. chrysogenum*. One of the media used was the defined MDFP medium, and the other the complex PDB medium. The extracts obtained from the filtrated broths were analyzed by LC-MS, and



---

chromatographic profiles generated were examined with the program MZmine2, which allowed to detect the appearance of changes in the profile of secondary metabolites produced in all conditions tested. The most significant changes in the profile of secondary metabolites occurred in the PDB medium with a concentration of 250  $\mu\text{M}$  of 5-azacitidine and 1  $\mu\text{M}$  of trichostatin A.

Molecular techniques were also used to modify the epigenetic regulation. A vector was constructed for gene silencing via the RNAi pathway (interfering RNA) of the *cclA* gene, whose product is part of the COMPASS complex, a transcriptional regulator that acts inducing formation of heterochromatin. Eight transformant strains were obtained with this silencing vector, which were analyzed by PCR to confirm the integration of the vector in the genome.

Finally, an analysis of the *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 genome was carried out with the bioinformatic software antiSMASH, in order to predict secondary metabolism clusters. The results showed a considerable increase in the number and class of clusters and predicted compounds in comparison to a study previously conducted in this fungus with other programs.

In summary, in this work different complementary strategies of genome mining were set with the purpose of finding new bioactive compounds produced by *P. chrysogenum*.



# Índice general

---

Índice de figuras	XXI
Índice de tablas	XXIII
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>3</b>
2.1. Los Metabolitos Secundarios . . . . .	3
2.2. Características Generales y Taxonomía de <i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 1951. . . . .	7
2.2.1. Características Generales . . . . .	7
2.2.2. Clasificación Taxonómica . . . . .	7
2.3. Histonas y Regulación Epigenética . . . . .	7
2.4. Regulación Epigenética del Metabolismo Secundario en Hongos . . . . .	8
2.4.1. Genes Participantes en el Modelamiento de la Cromatina . . . . .	10
2.4.1.1. Genes implicados en Metilación de las Histonas . . . . .	10
2.4.1.2. Genes Asociados a la Acetilación de las Histonas . . . . .	10
2.4.1.3. Genes Involucrados en Sumoilación de las Histonas . . . . .	11
2.5. Compuestos Químicos Modificadores de la Cromatina . . . . .	11
2.6. Estrategias de Minería Genómica en Hongos Filamentosos . . . . .	12
2.6.1. Herramientas Bioinformáticas . . . . .	13
2.6.2. Ingeniería Genética . . . . .	14
2.6.2.1. Activación de <i>Clusters</i> . . . . .	14
2.6.2.2. Expresión Heteróloga . . . . .	15
2.6.3. Modificadores de la Cromatina . . . . .	15
2.6.4. Recreación de Hábitat . . . . .	16

## ÍNDICE GENERAL

---

2.7. Silenciamiento de Genes Mediante RNAi . . . . .	18
<b>3. Planteamiento Principal</b> . . . . .	<b>19</b>
3.1. Justificación . . . . .	19
3.2. Hipótesis . . . . .	21
3.3. Objetivo General . . . . .	21
3.3.1. Objetivos Específicos . . . . .	21
<b>4. Materiales y Métodos</b> . . . . .	<b>23</b>
4.1. Equipos . . . . .	23
4.2. Microorganismos . . . . .	24
4.2.1. Cepas Bacterianas . . . . .	24
4.2.2. Cepas Fúngicas . . . . .	24
4.3. Vectores Plasmídicos . . . . .	24
4.4. Antibióticos . . . . .	26
4.5. Enzimas de Uso Comercial y Otros . . . . .	26
4.6. Compuestos remodeladores de la cromatina . . . . .	27
4.7. Oligonucleótidos . . . . .	27
4.8. Sistemas Comerciales (Kits) . . . . .	28
4.9. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución-Espectrometría de Masas (LC-MS) . . . . .	28
4.9.1. Columnas para Cromatografía Líquida de Alta Resolución UltraHPLC . . . . .	28
4.10. Programas Utilizados . . . . .	28
4.10.1. Software de Bioinformática . . . . .	28
4.10.1.1. antiSMASH . . . . .	28
4.10.2. Software para Análisis de Espectros LC-MS . . . . .	29
4.10.2.1. MZmine2 . . . . .	29
4.11. Medios de Cultivo . . . . .	29
4.11.1. Medios de Cultivo para Bacterias . . . . .	29
4.11.2. Medios de Cultivo para Hongo . . . . .	29
4.12. Métodos de cultivo de <i>P. chrysogenum</i> . . . . .	32
4.12.1. Cultivo y Mantenimiento de <i>P. chrysogenum</i> NRRL 1951 . . . . .	32
4.12.2. Condiciones de Crecimiento para la Preparación de Inóculo . . . . .	32
4.12.3. Cultivo en Medio Líquido Incorporando Remodeladores de la Cromatina . . . . .	33

4.12.3.1. Cultivo en Medio Líquido Complejo PDB y Definido MDFP . . . . .	33
4.12.4. Separación del Caldo de Cultivo . . . . .	33
4.13. Análisis de las Muestras por LC-MS . . . . .	34
4.14. Métodos de Extracción y Manipulación de ADN . . . . .	34
4.14.1. Obtención de ADN Genómico de <i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 1951 . . . . .	34
4.14.2. Extracción de ADN Plasmídico por Miniprep . . . . .	35
4.14.3. Extracción de ADN Plasmídico a Gran Escala: Megaprep . . . . .	35
4.14.4. Digestión de ADN con Endonucleasas de Restricción . . . . .	36
4.14.5. Desfosforilación de extremos 5' con Fosfatasa Alcalina . . . . .	37
4.14.6. Ligación de Fragmentos de ADN . . . . .	37
4.14.7. Transformación de <i>E. coli</i> . . . . .	37
4.14.8. Electroforesis de ADN en geles de agarosa . . . . .	38
4.14.9. Extracción de ADN de Geles de Agarosa . . . . .	38
4.14.10. Cuantificación de Ácidos Nucleicos . . . . .	38
4.15. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) . . . . .	39
4.16. Transformación de <i>P. chrysogenum</i> por Protoplastos . . . . .	41
4.16.1. Obtención de Protoplastos . . . . .	41
4.16.2. Transformación de Protoplastos . . . . .	42
4.16.3. Selección de Transformantes . . . . .	43
4.17. Mecanismo de Silenciamiento del Gen <i>cclA</i> de <i>P. chrysogenum</i> . . . . .	43
4.18. Predicción Bioinformática de <i>Clusters</i> Silentes del Metabolismo secundario	45
4.18.1. Datos de Entrada en antiSMASH ( <i>Input data</i> ) . . . . .	45
4.18.2. Datos resultantes de antiSMASH ( <i>Output</i> ) . . . . .	45
<b>5. Resultados</b>	<b>47</b>
5.1. Análisis del Cambio en el Perfil de Metabolitos Inducido por el Remodelador de la Cromatina 5-azacitidina (5-aza) . . . . .	47
5.1.1. Aplicación de 5-aza a Medios de Cultivo Líquidos de <i>P. chrysogenum</i> : MDFP y PDB . . . . .	47
5.2. Análisis del Cambio en el Perfil de Metabolitos Inducido por el Modificador de la Cromatina Tricostatina A (TSA) . . . . .	50
5.2.1. Aplicación de TSA a Medios de Cultivo Líquidos de <i>P. chrysogenum</i> : MDFP y PDB . . . . .	50
5.3. Identificación de <i>cclA</i> <i>in silico</i> . . . . .	50
5.4. Clonación del Gen <i>cclA</i> en pBluescript KS (+) . . . . .	50

## ÍNDICE GENERAL

---

5.4.1. Amplificación por PCR del Gen <i>cclA</i> . . . . .	50
5.4.2. Construcción del plásmido pBKScclA . . . . .	53
5.5. Construcción del Vector pSiRNA-cclA . . . . .	55
5.5.1. Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>cclA</i> para silenciamiento por RNAi . . . . .	55
5.5.2. Clonación del fragmento para silenciamiento del gen <i>cclA</i> en el Vector pGpdPki-RNAi . . . . .	55
5.6. Transformación de <i>P. chrysogenum</i> NRRL 1951 con los Vectores pSiRNA-cclA y pGpdPki-RNAi . . . . .	55
5.6.1. Análisis por PCR de Transformantes . . . . .	57
5.7. Análisis del genoma de <i>P. chrysogenum</i> para buscar genes de metabolismo secundario con el <i>Software</i> antiSMASH . . . . .	57
<b>6. Discusión</b>	<b>61</b>
6.1. Análisis del Cambio en el Perfil de Metabolitos Inducido por el Remodelador de la Cromatina 5-azacitidina . . . . .	61
6.2. Análisis del Cambio en el Perfil de Metabolitos Inducido por el Remodelador de la Cromatina Tricostatina A . . . . .	63
6.3. Transformación de <i>P. chrysogenum</i> NRRL 1951 con los Vectores pSiRNA-cclA y pGpdPki-RNAi . . . . .	64
6.4. Análisis del genoma de <i>P. chrysogenum</i> para buscar genes de metabolismo secundario con el <i>Software</i> antiSMASH . . . . .	66
<b>7. Conclusiones y Perspectivas</b>	<b>69</b>
7.1. Conclusiones . . . . .	69
7.2. Perspectivas . . . . .	70
<b>Bibliografía</b>	<b>71</b>
<b>Apéndices</b>	<b>82</b>
<b>A. BLAST</b>	<b>85</b>
<b>B. MZmine2</b>	<b>87</b>
<b>C. antiSMASH</b>	<b>99</b>

## Índice de figuras

---

2.1. Principales rutas metabólicas del metabolismo primario que son precursores de los metabolitos secundarios en hongos. Figura modificada de García-Estrada y Martín 2015 (39).	5
2.2. Algunas proteínas de la regulación global de metabolitos secundarios en hongos. Figura modificada de Brakhage 2013 (18).	6
2.3. Esquema general de un nucleosoma, unidad fundamental de la cromatina.	9
2.4. Diferentes estrategias en la minería genómica para conseguir la expresión de <i>clusters</i> silentes del metabolismo secundario.	17
4.1. Mapa circular de plásmidos empleados en este trabajo.	25
4.2. Mecanismo de silenciamiento por transcripción convergente	44
5.1. Cromatogramas de LC-MS correspondientes al experimento con 5-aza	48
5.2. Señalización de variaciones en segmentos de los cromatogramas de LC-MS correspondientes al experimento con 5-aza.	49
5.3. Señalización de variaciones en cromatogramas de LC-MS correspondiente al experimento con 5-aza.	49
5.4. Cromatogramas de LC-MS correspondientes al experimento con TSA	51
5.5. Señalización de variaciones en segmentos del cromatograma de LC-MS correspondiente al experimento con 1 $\mu$ M de TSA.	52
5.6. Señalización de variaciones en segmento del cromatograma de LC-MS correspondientes al experimento con 0.25 $\mu$ M de TSA.	53
5.7. Construcción del vector pBKScclA	54
5.8. Construcción del vector pSiRNA-cclA.	56
5.9. Cepas transformante con los vectores pSiRNA-cclA y pGpdPki-RNAi.	58
5.10. Análisis por PCR de transformantes.	59
A.1. Resumen gráfico del Blast de la proteína de <i>A. nidulans</i> (AN9399.2) frente a <i>P. chrysogenum</i> wisconsin 54-1255	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

B.1. MZmine1 . . . . .	88
B.2. MZmine2 . . . . .	89
B.3. MZmine3 . . . . .	90
B.4. MZmine4 . . . . .	91
B.5. MZmine5 . . . . .	92
B.6. MZmine6 . . . . .	93
B.7. MZmine7 . . . . .	94
B.8. MZmine8 . . . . .	95
B.9. MZmine9 . . . . .	96
B.10.MZmine10 . . . . .	97
B.11.MZmine11 . . . . .	98
C.1. antiSMASH1 . . . . .	99
C.2. antiSMASH2 . . . . .	100
C.3. antiSMASH3 . . . . .	101
C.4. antiSMASH4 . . . . .	102
C.5. antiSMASH5 . . . . .	103

## Índice de tablas

---

2.1. Clasificación taxonomía de <i>P. chrysogenum</i> NRRL 1951. Tomado de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) . . . . .	8
2.2. Compuestos químicos remodeladores de la cromatina utilizados en hongos. . . . .	12
2.3. Programas y base de datos bioinformáticos disponibles para la predicción de <i>clusters</i> crípticos del metabolismo secundario. . . . .	14
4.1. Listado de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. . . . .	27
4.2. Mezcla de reacción para PCR con <i>PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase</i> . . . . .	39
4.3. Mezcla de reacción para PCR con <i>Taq</i> polimerasa . . . . .	40
4.4. Condiciones de operación del termociclador de la PCR de los genes a analizar ( <i>PfuUltra II Fusion</i> ). . . . .	40
4.5. Condiciones de operación del termociclador de la PCR de los genes a analizar ( <i>Taq</i> polimerasa). . . . .	40
5.1. Resumen de <i>clusters</i> de MS identificados con antiSMASH en el genoma de <i>Penicillium chrysogenum</i> . . . . .	60



## Abreviaturas

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
dNTPs	Mezcla de desoxirribonucleotidos trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
g	Gramo
<i>g</i>	Gravedades
h	Hora / Horas
kb	Kilobase
L	Litro
M	Molar
mm	Milímetros
min	Minutos
mM	Milimolar
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
PEG	Polietilenglicol
pg	Picogramo
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volumen
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
$\lambda$	Longitud de onda
v/v	Volumen/volumen
°C	Grados centígrados



# Introducción

---

El hongo *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 fue aislado en 1943, esta cepa presentó altos niveles de producción de  $\beta$ -lactámicos, permitiendo la purificación y producción a nivel industrial de la primera molécula con actividad de gran espectro antibacterial (6).

Recientes investigaciones han mostrado una variedad de compuestos adicionales y de interés terapéutico que producen las diferentes variantes generadas de esta cepa (1). Es por tanto de gran relevancia conocer que otra clase de compuestos puede producir la cepa NRRL 1951; la primera cepa que dió partida al linaje de cepas productoras de  $\beta$ -lactámicos.

En este trabajo se abordan algunas estrategias de minería genómica centradas en la regulación epigenética de los genes del metabolismo secundarios en hongos filamentosos. Estas metodologías han demostrado ser efectivas para producir nuevos compuestos; ya que muchos de los clusters biosintéticos del metabolismo secundario se encuentran silenciados (clusters crípticos), lo cual dificulta el descubrimiento de nuevos compuestos en condiciones habituales de laboratorio (86, 105).

En este trabajo se presenta en primer lugar (capítulo 2), la literatura correspondiente a los metabolitos secundarios, sus diferentes mecanismos de regulación, y nos centraremos específicamente en el mecanismo de la regulación epigenética y las diferentes estrategias de minería genómica relacionadas con el mismo.

En el tercer capítulo, se hace el planteamiento principal, con la justificación, la hipótesis y objetivos propuestos para esta investigación.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

En el cuarto capítulo, se describen todos los recursos que se emplearon durante la realización de los ensayos con los modificadores o remodeladores de la cromatina; así como su análisis, la construcción del plásmido de silenciamiento para un gen implicado en la regulación epigenética y el uso de programas bioinformáticos.

Seguidamente en el quinto capítulo se presentan los resultados obtenidos aplicando la metodología descrita en el cuarto capítulo. En el capítulo sexto se examinan y se hace la discusión de los resultados obtenidos. Por último en el séptimo capítulo se señalan las conclusiones y perspectivas generadas en el presente trabajo. Finalmente se adjuntan los anexos con la información adicional de los análisis y de las aplicaciones utilizadas.

## 2.1. Los Metabolitos Secundarios

Se conoce a los metabolitos secundarios (MS) normalmente por ser moléculas de bajo peso molecular, los cuales no son esenciales para el crecimiento y viabilidad de microorganismos o plantas. Los MS derivan de los metabolitos primarios y su producción se da principalmente durante la fase estacionaria de la curva de crecimiento, cuando los nutrientes del medio se han agotado. La producción de metabolitos secundarios en hongos está a menudo correlacionada con una etapa específica de la diferenciación morfológica (54). Si bien los MS no son vitales para el desarrollo de los hongos, estos se encuentran involucrados en su supervivencia, ya sea para establecer interacciones en su entorno, defenderse o dándole ventajas al competir ante otro microorganismo en su medio (31). Los metabolitos secundarios han sido de gran utilidad para el hombre desde la antigüedad. Uno de los más conocidos y difundido ha sido la penicilina, descubierto en los años veinte; fue el primer antibiótico de amplio espectro que salvó miles de vidas durante la segunda guerra mundial, dando entonces un giro a la investigación farmacológica de la época (99). Desde entonces el interés por las propiedades bioactivas de los MS, no ha dejado de crecer, en la actualidad se han descubierto miles de sustancias. Muchos de los metabolitos secundarios aislados de hongos poseen actividad antifúngica, antimicrobiana y antitumoral (76). Sin embargo, otros muchos metabolitos secundarios muestran efectos adversos para el ser humano, como citotoxicidad, mutagénesis, carcinogénesis e inmunosupresión entre otras (54).

La carrera hacia la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios bioactivos y con aplicación farmacológica, como por ejemplo antibióticos, hizo que en las últimas décadas las grandes farmacéuticas desarrollaran nuevas herramientas para la búsqueda de

## 2. ANTECEDENTES

---

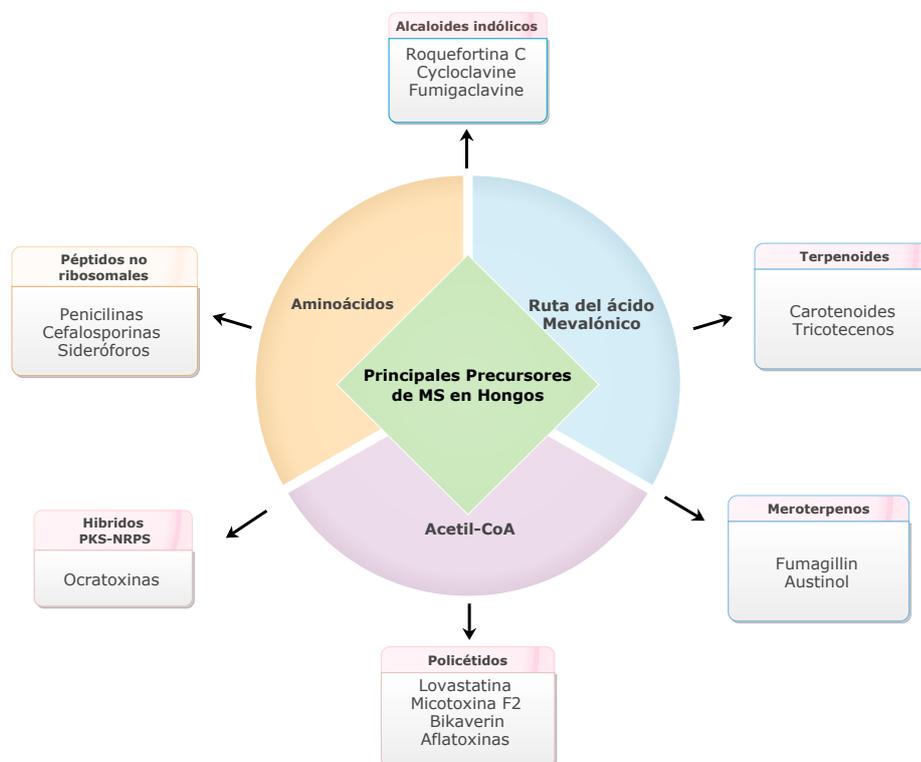
nuevos compuestos (27). Dentro de los esfuerzos por agilizar esta búsqueda está la utilización de la información contenida en los genomas microbianos como se mencionará más adelante.

Estudios llevados a cabo a nivel genético permitieron establecer que los genes biosintéticos de MS se encuentran agrupados en *clusters* (53). Un ejemplo de la exploración por conocer la agrupación de los genes de biosíntesis de penicilina fue realizada en 1990 por Díez *et al.* (32) y en 1995 por Fierro *et al.* (34), también en *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus fumigatus* (22).

En los *clusters* de las vías biosintéticas de metabolitos secundarios se ven implicadas numerosas enzimas como, policétido sintasas (PKS), péptidos no ribosomales sintasas (NRPS), y terpeno ciclasas entre otras (54), las cuales proveen las moléculas más abundantes como lo son los policétidos sintetizados por enzimas PKS del tipo I, péptidos no ribosomales (NRP) los que son péptidos pequeños cuya síntesis es independiente del ribosoma y son sintetizados por enzimas NRPS, así mismo hay estructuras de compuestos híbridos participando enzimas PKS-NRPS, y del tipo terpenoides, sintetizado por enzimas terpeno ciclasas (47). Ejemplos de estos compuestos del MS que se derivan de las vías de biosíntesis de Metabolitos Primarios, se esquematizan en la figura 2.1.

La regulación en la expresión de los genes en la biosíntesis de los MS en hongos filamentosos está relacionada con la respuesta a estímulos de factores externos e internos que inciden en los *clusters* figura 2.2, donde interviene la fuente de carbono, de nitrógeno, el estrés, la luz, el pH, entre otros. La regulación esta mediada por factores de transcripción y participan también reguladores globales como *LaeA*, que actúan mediante la remodelación de la cromatina; este tipo de regulación se conoce también como epigenética y se comentará más adelante (19). También es propio de los hongos que la regulación de MS esté relacionada con los procesos de diferenciación fúngica, comúnmente en la esporulación (10). La regulación de la biosíntesis de penicilina ha sido descrita tanto en *Penicillium chrysogenum* como en *A. nidulans* (20, 21).

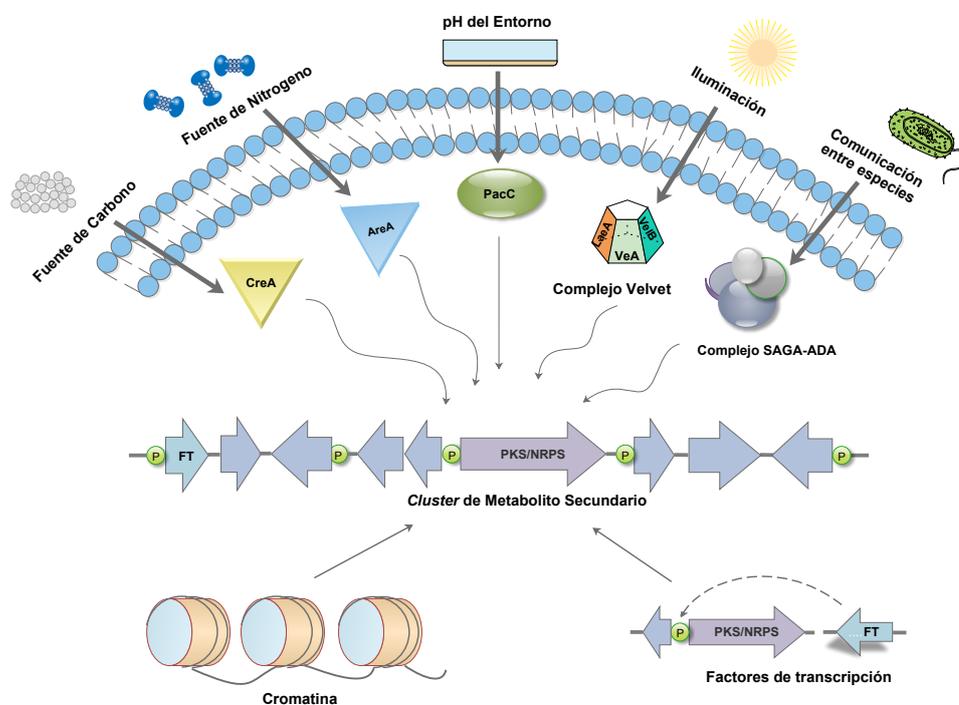
En la actualidad, el análisis de los genomas completos de microorganismos como bacterias y hongos ha permitido descubrir *clusters* del metabolismo secundario que no estaban reportados, y cuyos productos son a menudo desconocidos. Este tipo de análisis, junto con las herramientas moleculares utilizadas para activar la expresión de estos



**Figura 2.1:** Principales rutas metabólicas del metabolismo primario que son precursores de los metabolitos secundarios en hongos, exponiendo a PKS, NRPS, terpenoides, alcaloides indólicos, híbridos de PKS-NRPS, meroterpenos, con ejemplos de compuestos.

*clusters* e identificar los productos sintetizados se conoce con el nombre de Minería Genómica (*Genome Mining*). Para llevar a cabo esta metodología se han desarrollado algoritmos bioinformáticos que utilizan la información de la secuencia genómica para localizar clusters del metabolismo secundario. (94). Sin embargo, muchos de los *clusters* del metabolismo secundario que son encontrados mediante los *softwares* bioinformáticos no son expresados en condiciones de cultivo en el laboratorio, lo que obstaculiza el aislamiento y la elucidación de la estructura los nuevos compuestos, por esta razón se les denomina a estos *clusters* “silentes” o “crípticos” (46).

Para activar estos *cluster* crípticos la minería genómica ha planteado diversas estrategias para inducir la biosíntesis de las moléculas, entre ellas la remodelación de la cromatina utilizando genes o compuestos químicos que modifican el estado de condensación de la cromatina, la sobreexpresión de reguladores específicos del cluster



**Figura 2.2:** Algunas proteínas de la regulación global de metabolitos secundarios como el complejo SAGA-ADA, (Spt-Ada-Gcn5-acetiltransferasas); el complejo velvet; *laeA* *VeA* y *velB* ; los Factores de transcripción *PacC* , *CreA* y *AreA* y modificaciones en la cromatina que participan en regulación de *clusters* de genes de metabolitos secundarios. Las señales que provienen del ambiente influyen en los *clusters* intermediado por las proteínas reguladora que responden a estos estímulos al mismo tiempo que alteran la expresión de estos. En el centro se representa un *cluster* de metabolito secundario, posee un gen que puede ser de un policétido (PKS), un péptidos no ribosomales (NRPS) o un híbrido PKS-NRPS.

biosintético, simulación de entornos naturales (incluyendo el co-cultivo con microorganismos autóctonos), entre otras que se abordaran posteriormente (18, 19).

Los antecedentes han demostrado que la minería genómica es una poderosa e innovadora herramienta para la exploración, expresión y obtención de diversos y novedosos metabolitos secundarios en hongos filamentosos (107). Por lo tanto la intención de este estudio es aplicar algunas de las metodologías usadas en la modificación de la regulación epigenética en hongos enfocada en la producción de metabolitos secundarios en la cepa *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951.

## 2.2. Características Generales y Taxonomía de *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951.

### 2.2.1. Características Generales

La cepa silvestre *P. chrysogenum* NRRL 1951, es productora de penicilina, un antibiótico de la familia de los  $\beta$ -lactámicos, y productora de otros MS como la crisogenina, meleagrín, roquefortina (C, D) (49). Esta cepa fue aislada de un melón por el departamento de agricultura del NRRL (the Northern Regional Research Laboratory) en un mercado de Peoria, Illinois, y fue sometida a mutaciones aleatorias (rayos X, luz UV) dando origen a *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (80, 81) cuyo genoma fue secuenciado posteriormente en el 2008 (98).

*P. chrysogenum* NRRL 1951 es un hongo filamentoso del grupo de los ascomicetos, su reproducción se da de manera asexual con la formación de esporas asexuales (conidios o mitosporas) y sexual por medio de producción de ascosporas meióticas (meiosporas) (13). La ruta biosintética de la penicilina ha sido ya descrita (61), asimismo los genes biosintéticos están agrupados en un *cluster* de unas 17 kb (35) y como se mencionó anteriormente se conocen muchos aspectos de la regulación de esta ruta de biosíntesis (20, 21).

### 2.2.2. Clasificación Taxonómica

Recientemente esta cepa se ha reclasificado como *Penicillium rubens* NRRL 1951 (tabla 2.1) en un estudio filogenético molecular (49), aunque para fines de este estudio seguiremos refiriéndonos a esta especie como *P. chrysogenum* NRRL 1951.

## 2.3. Histonas y Regulación Epigenética

La cromatina es la encargada en el núcleo de células eucariotas de empaquetar y compactar el ADN en diferentes niveles hasta formar los cromosomas; el nucleosoma es la unidad fundamental de la cromatina que está conformado por 146 pb de ADN que se envuelven alrededor de un núcleo de proteínas. Este núcleo o “*core*” posee dos copias de cada histona, H2A, H2B, H3 y H4, ensambladas en un octámero como se aprecia en

<i>Taxonomía de P. rubens NRRL 1951</i>
<b>Super Reino:</b> Eukariota
<b>Reino:</b> Fungi.
<b>Filum:</b> Ascomycota.
<b>Subfilum:</b> Pezizomycotina.
<b>Clase:</b> Eurotiomycetes.
<b>Orden:</b> Eurotiales.
<b>Familia:</b> Trichocomaceae.
<b>Género:</b> <i>Penicillium</i>
<b>Especie:</b> <i>Penicillium rubens</i> NRRL 1951
<b>NCBI ID:</b> 500485

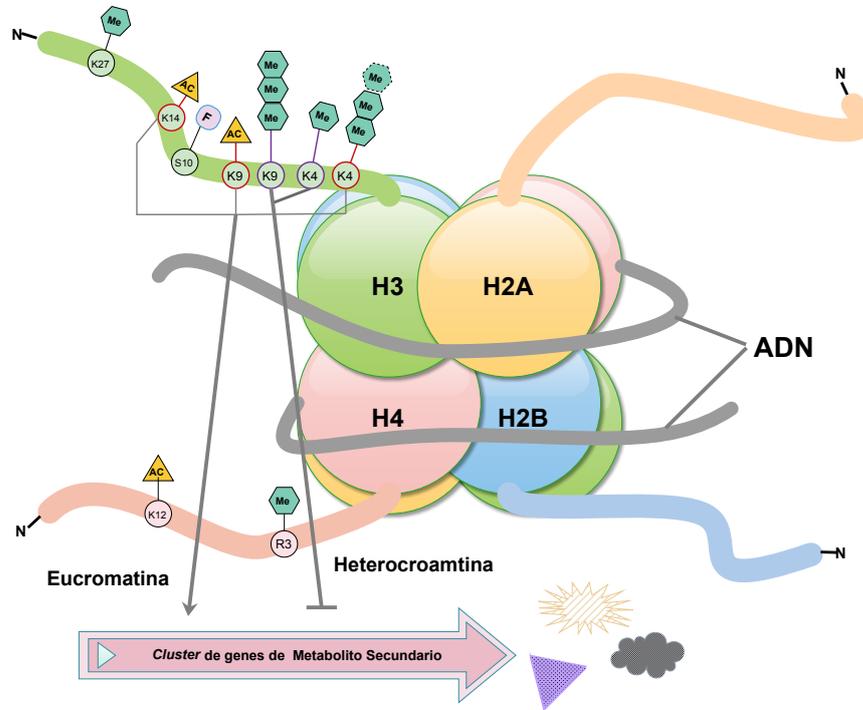
**Tabla 2.1:** Clasificación taxonomía de *P. chrysogenum* NRRL 1951. Tomado de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information)

la figura 2.3; siendo entonces el nucleosoma un determinante primordial para el acceso de la maquinaria de transcripción de genes al ADN (63).

En ciertas regiones de los cromosomas la cromatina se encuentra dispuesta como heterocromatina (telómeros, centrómeros) rica en secuencias repetidas, los nucleosomas se hallan altamente condensados, por lo tanto la transcripción no ocurre o es baja. Sin embargo, si se encuentra dispuesta en eucromatina, los nucleosomas se encuentran menos condensados estando entonces activa a la transcripción (59). Se demostró en *A. nidulans*, que los *clusters* de MS tienden a localizarse en las regiones subtelómericas, dependiendo entonces del estado de la cromatina para ser expresados, un hecho evidenciado por Palmer y colaboradores en 2010 (75). Las proteínas de los nucleosomas pueden sufrir diversas modificaciones postraduccionales (figura 2.3), como acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación entre otras, en los extremos de la histona tres (H3) e histona cuatro (H4) (38).

## 2.4. Regulación Epigenética del Metabolismo Secundario en Hongos

La epigenética se puede definir como cambios reversibles, y en ocasiones, hereditarios en los niveles de expresión de un gen sin alterar las secuencias del ADN. Dicho fenómeno ocurre en ADN y cromatina, en donde esta interviene a su vez en la regulación epigenética de los *clusters* de MS, relacionados con las modificaciones de las histonas



**Figura 2.3:** Esquema general de un nucleosoma, la unidad fundamental de la cromatina. Se muestra en el centro las proteínas de las histonas que lo conforman, con sus modificaciones postraduccionales: acetilación (AC), fosforilación (F) y metilación (Me); que se dan en determinados aminoácidos: arginina (R), lisina (K) y Serina (S). Estas modificaciones reportadas en hongos filamentosos pueden dar lugar a heterocromatina reprimiendo la expresión de *clusters* de metabolitos secundarios o a eucromatina permitiendo la expresión de los *clusters* como se muestra en la parte inferior.

que pueden encontrarse acetiladas (AC) o metiladas (ME) en el aminoácido lisina (K). Estas se encuentran a lo largo del extremo N-terminal de la histona 3, la cual es crítica en la formación de heterocromatina o eucromatina (figura 2.3) (18).

Los hongos también metilan su ADN como otro mecanismo de regulación epigenética en la expresión génica durante su ciclo de vida. La metilación del ADN junto con modificaciones en la cromatina como la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 y HP1 (proteína de Heterocromatina 1), localizados en centrómeros y telómeros, funcionan como sistema de defensa del genoma frente a la repetición inducida por mutación puntual (48).

En estos últimos años se han descrito en hongos varias enzimas que regulan la disposición de la cromatina mediante modificaciones químicas de las histonas. Las intervenciones para inactivar o sobreexpresar los genes que codifican dichas enzimas mostraron importantes efectos en la producción de MS.

### 2.4.1. Genes Participantes en el Modelamiento de la Cromatina

#### 2.4.1.1. Genes implicados en Metilación de las Histonas

El regulador global *LaeA* es una metiltransferasa encontrada inicialmente en *A.nidulans*. Cuando el gen *laeA* fue inactivado disminuyó la expresión de MS, y cuando se sobreexpresó aumentó la expresión de *clusters* de MS por medio de modificación de las histonas y consecuentemente de la cromatina (16, 17). *LaeA* forma un complejo heterotrimérico con dos proteínas: *VeA* y *VelB*, denominado complejo Velvet, el cual regula procesos como la diferenciación sexual y asexual en respuesta a estímulos de luz (8). Este gen también está presente en *P. chrysogenum*, y cuando *LaeA* se sobreexpresó aumentó la producción de penicilina; en cambio la ausencia de *LaeA* reduce drásticamente la producción de penicilina y de la diferenciación asexual para la producción de conidios (56). La metiltransferasa *ClrD*, encargada de la trimetilación de H3K9 (lisina 9 de la histona 3) y la unión de *HepA* (homólogo HP1) está asociada a la heterocromatina y por lo tanto al silenciamiento de los *clusters*; sin embargo la mutación de *LaeA*, revirtió este efecto (83).

Posteriormente se caracterizó la histona metilasa *cclA* (14), que forma parte del complejo COMPASS (complejo de proteína asociado con Set1), un efector transcripcional que actúa sobre la cromatina como metiltransferasa en la lisina 4 de la histona 3. En *A. nidulans*, la delección de *cclA* condujo a la reducción de los niveles de dimetilación y trimetilación de la lisina 4 de la histona 3, lo que ocasionó un cambio en el perfil de producción de metabolitos secundarios. Igualmente se obtuvieron cambios en las cepas *A. fumigatus* (74) y *Aspergillus oryzae* (87). Lo más destacable en estos estudios ha sido la expresión de *clusters* de MS que se encontraban previamente silenciados, denominados *clusters* crípticos.

#### 2.4.1.2. Genes Asociados a la Acetilación de las Histonas

La acetilación acontece específicamente en condiciones fisiológicas distintas, y puede ser reversible y regulada por histonas desacetilasas (HDAC), siendo muy importante su

papel en la regulación de *clusters* de MS. Shwab *et al.* (2007) obtuvieron mutantes que carecían de una actividad HDAC por delección del gen *hdaA* (histona desacetilasa A) en *A. nidulans*. Los mutantes  $\Delta hdaA$  mostraban una activación concreta en los *clusters* próximos a regiones teloméricas y un aumento en la producción de los metabolitos penicilina y esterigmatocistina (88), de igual forma en mutantes  $\Delta hdaA$  de *A. fumigatus* se obtuvieron resultados similares (58).

De equivalente trascendencia en la regulación de MS son las histonas acetiltransferasas (HAT), como se evidenció en *A. nidulans* al caracterizarse la HAT *GcNE* que pertenece al complejo SAGA-ADA (Spt-Ada-Gcn5-acetiltransferasas). Esta HAT está implicada en el aumento de la acetilación de la lisina 14 en la histona 3 en las regiones promotoras de la biosíntesis de ácido orselínico, al mismo tiempo que incrementó la biosíntesis de penicilina y terrequinona (72).

#### 2.4.1.3. Genes Involucrados en Sumoilación de las Histonas

SUMO es una pequeña proteína modificadora de tipo ubiquitina, participante del desarrollo sexual y la estimulación lumínica del desarrollo asexual. La delección en *A. nidulans* de SUMO mostró un bloqueo del desarrollo sexual, y las metiltransferasas *cclA* y *SetA*, que son subunidades del complejo COMPASS, demostraron estar interconectadas con la red SUMO en la modificación de histonas (43). En levaduras se identificó que SUMO regula el funcionamiento de *Gcn5* (HAT), que como se indicó, forma parte de SAGA-ADA, provocando el silenciamiento de genes (92).

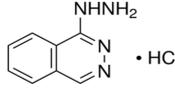
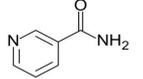
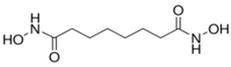
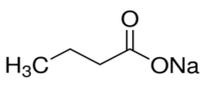
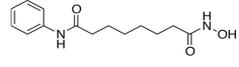
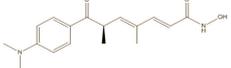
## 2.5. Compuestos Químicos Modificadores de la Cromatina

En la actualidad existen en el mercado una serie de pequeños compuestos químicos que inhiben la actividad de enzimas remodeladoras de la cromatina; de esta manera la manipulación epigenética puede inducir la expresión de los *clusters* silentes produciendo nuevos MS en hongos.

El modo de acción de estos compuestos químicos puede ser de dos formas, la primera consiste en inhibir las HDAC que alteran las histonas, las cuales interactúan con el ADN, y la segunda son compuestos que inhiban la actividad ADN metiltransferasas

## 2. ANTECEDENTES

(DNMT) (37). En la tabla 2.2 se muestran los compuestos químicos empleados para esta finalidad en hongos, la mayoría filamentosos.

Clase	compuesto	Blanco	Hongo	Potencia	Estructura	Fuente Bibliográfica
Pirimidina	*5-Azacitidina (5-aza)	DNMT	<i>Penicillium citreonigrum</i> y <i>Cladosporium cladosporioides</i>	μmol/L		Wang, Xiaoru, et al. 2010 ; Williams, Russell B., et al. 2009
Piridazina	Clorhidrato de Hidralazina	DNMT	Hongos Endófitos	μmol/L		González-Menéndez, Víctor, et al. 2006
Amida	Nicotinamida	HDAC	<i>Chaetomium concroideum</i>	μmol/L		Asai, Teigo, et al. 2016
Ácido graso de cadena corta	Ácido Suberohidroxámico (SBHA)	HDAC	Hongos Endófitos	μmol/L		Chen, Han-Jing, et al. 2013
Ácido graso de cadena corta	Butirato de sodio	HDAC	<i>Leucostoma persoonii</i>	μmol/L		Beau, Jeremy, et al. 2012
Ácidos hidroxámicos	Ácido hidroxámico suberoilaniida (SAHA)	HDAC	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	μmol/L		Williams, Russell B., et al. 2008
Ácidos hidroxámicos	*Tricostatina A (TSA)	HDAC	<i>Alternaria alternata</i> y <i>Penicillium expansum</i>	nmol/L		Shwab, E. Keats, et al. 2007

**Tabla 2.2:** Compuestos químicos remodeladores de la cromatina utilizados en hongos.  
\*Compuestos empleados en este estudio.

## 2.6. Estrategias de Minería Genómica en Hongos Filamentosos

Como ya se indicó anteriormente, los *clusters* de metabolitos secundarios pueden codificar enzimas biosintéticas para una variedad de compuestos como PKS, NRPS y algunos otros (figura 2.1) de utilidad para la industria farmacéutica y agrícola principalmente. Frecuentemente no se expresan bajo condiciones estándar de cultivo, denominándolos entonces como *clusters* crípticos o silentes.

Actualmente podemos acceder a numerosas secuencias de genomas de los Ascomycota que se encuentran en plataformas como NCBI, siendo estas un valioso recurso para realizar búsquedas de *clusters* silentes. El número total de *clusters* del metabolismo secundario que se encuentran en un genoma fúngico generalmente es muy superior al número de MS conocidos que produce un hongo; se calcula que alrededor de un porcentaje mayor de 70 % del genoma permanece silenciado (37).

La exploración de estos genomas facilitó el desarrollo la minería genómica que comprende un conjunto de técnicas que tienen como propósito la detección e identificación de nuevos compuestos, utilizando la información que se encuentra en la secuencia genómica. Dentro de las estrategias de la minería genómica se encuentran aquellas orientadas a activar la expresión de *clusters* del metabolismo secundario que permanecen silenciados, y de este modo conseguir que el hongo produzca el compuesto correspondiente a este *cluster*; entonces se elucidará y caracterizará (104). Siendo por tanto la minería genómica, una llave para descubrir cuantiosas moléculas bioactivas de relevancia. Podemos decir que las estrategias están encaminadas a determinar el posible producto de estos *clusters*.

### 2.6.1. Herramientas Bioinformáticas

La secuenciación de los genomas y la minería genómica *in silico* para hongos y bacterias ha llevado a desarrollar herramientas bioinformáticas que detectan rutas biosintéticas de *clusters* de MS (figura 2.4), siendo esto un importante paso para disminuir la brecha hacia el descubrimiento de novedosas moléculas. Una variedad de programas en la actualidad se encuentran disponibles en la *web* para hacer dichas predicciones (tabla 2.3). En 2008, van den Berg y colaboradores emplearon el programa SMURF (Secondary Metabolite Unique Region Finder) para *P. chrysogenum* Wisconsin54-1255 donde se identificaron 33 *clusters* para MS, de los cuales fueron 20 para PKS; 10 para NRPS; 2 híbridos de NRPS-PKS y 1 Dimetilalil triptófano sintasa (DMTAS) (98); con este mismo programa fueron analizados un par de años después los genomas de varias especies de *Aspergillus*, identificándose 105 *clusters* en total siendo 65 de estos para NRPS o enzimas similares, 8 híbridos de NRPS-PKSs y 15 DMTAS (50).

En 2011 fue presentado antiSMASH (antibiotics and Secondary Metabolite Analysis SHell), un servidor *web* y un *software* independiente que facilita la identificación genómica automática y análisis de *clusters* de genes biosintéticos; tanto en bacterias

## 2. ANTECEDENTES

---

Programa	URL	Ref.
2metDBa	<a href="http://secmetdb.sourceforge.net/">http://secmetdb.sourceforge.net/</a>	(5)
*antiSMASH	<a href="http://antismash.secondarymetabolites.org">http://antismash.secondarymetabolites.org</a>	(101)
CASSIS and SMIPS	<a href="https://sbi.hki-jena.de/smips/Download.php">https://sbi.hki-jena.de/smips/Download.php</a>	(106)
CLUSEAN	<a href="https://bitbucket.org/tilmweber/clusean">https://bitbucket.org/tilmweber/clusean</a>	(103)
ClusterFinder	<a href="https://github.com/petercim/ClusterFinder">https://github.com/petercim/ClusterFinder</a>	(29)
ClustScan Professional	<a href="http://bioserv.pbf.hr/cms/index.php?page=clustscan">http://bioserv.pbf.hr/cms/index.php?page=clustscan</a>	(91)
FunGeneClusterS	<a href="https://fungiminions.shinyapps.io/FunGeneClusterS/">https://fungiminions.shinyapps.io/FunGeneClusterS/</a>	(2)
MIDDAS-M	<a href="http://133.242.13.217/MIDDAS-M/">http://133.242.13.217/MIDDAS-M/</a>	(97)
MIPS-CG	<a href="http://www.fung-metb.net/">http://www.fung-metb.net/</a>	(97)
NaPDos	<a href="http://napdos.ucsd.edu/">http://napdos.ucsd.edu/</a>	(111)
NP.searcher	<a href="http://dna.sherman.lsi.umich.edu/">http://dna.sherman.lsi.umich.edu/</a>	(60)
SMURF	<a href="http://jcvi.org/smurf/index.php">http://jcvi.org/smurf/index.php</a>	(55)
GNP/PRIMS	<a href="http://magarveylab.ca/gnp/#!/genome">http://magarveylab.ca/gnp/#!/genome</a>	(89)

---

**Tabla 2.3:** Programas y base de datos bioinformáticos disponibles para la predicción de *clusters* crípticos del metabolismo secundario.

\*Programa utilizado en este estudio.

como hongos (65).

Su interface es amigable y fácil para ingresar los datos, dando una amplia gama de opciones. La última versión hasta la fecha, es la versión 3.0, la cual ofrece la posibilidad de detectar 44 clases diferentes de *clusters* de genes biosintéticos. Otra facilidad en esta versión es la del manejo de la salida de datos (resultados) por parte del usuario, ya que permite por medio de otro *software* manejar los datos, sin necesidad de conexión a la red (101). Lo que resulta hasta el momento en un programa robusto para la predicción de *clusters* de MS.

### 2.6.2. Ingeniería Genética

#### 2.6.2.1. Activación de *Clusters*

Por medio de las diferentes metodologías que nos ofrece la ingeniería genética se puede manipular a los diferentes genes integrantes de los mecanismos reguladores implicados en las rutas biosintéticas de los posibles MS. Los *clusters* crípticos de MS pueden ser activados induciendo la sobreexpresión de factores de transcripción específicos como *apdR*, que se realizó en *A.nidulans* obteniéndose nuevas moléculas como aspyridones A y B (figura2.4) que por otra parte se desconocía que este hongo las pro-

dujera (12).

Como se detalló anteriormente están los reguladores globales como *LaeA*, su delección  $\Delta$ *LaeA* permitió delimitar la extensión de algunos clusters del metabolismo secundario y descubrir otros nuevos en *A. nidulans*, y asimismo se logró la producción de Terrequinone A (figura 2.4), un compuesto antitumoral (15). La sobreexpresión de *LaeA* provocó el aumento de penicilina en *P. chrysogenum* (56). Con la delección de *cclA* (figura 2.4), integrante del complejo COMPASS en *A. nidulans*, se identificaron nuevos compuestos como monodictiphenone y emodins (14). En *A. fumigatus* con la delección de *cclA* se obtuvo más síntesis de gliotoxina (74) y en *A. oryzae* se identificaron dos moléculas, 14-deacetyl astellolide A y B, que mostraron tener actividad citotóxica (87).

#### 2.6.2.2. Expresión Heteróloga

Este método consiste en la transferencia de genes de un *cluster* de MS. Dicha transferencia se realiza mediante la clonación del *cluster* o la síntesis *in vitro* del mismo y la transformación genética de una cepa hospedadora, la cual óptimamente debe ser una “cepa vacía”, es decir, que no posea clusters propios de MS, o bien que su número se haya reducido, con el fin de detectar y purificar con mayor facilidad el compuesto producido por el cluster que se ha transferido. Un ejemplo es la producción de Neosartoricin C (figura 2.4) luego de transformar *A. nidulans* con un *cluster* críptico proveniente de un dermatofito *Trichophyton tonsurans* (109).

#### 2.6.3. Modificadores de la Cromatina

Se han empleado compuestos químicos remodeladores de la cromatina descritos anteriormente (tabla 2.2) para inducir la producción de diferentes y nuevos MS. Por ejemplo, se utilizó TSA 1  $\mu$ M en cultivos de *P. expansum* y *A. alternata*, observándose un aumento en el número de MS producidos, algunos de los cuales no habían sido descritos como producidos por estas especies (88). El compuesto 5-aza, inhibidor de HMT y DNMT, se utilizó en *Diatrype sp.* y se determinaron dos nuevos policétidos glicosilados, lunalides A y B (105).

Henrikson *et al.* (2009) utilizaron 10  $\mu$ M de SAHA en *Aspergillus niger*, y después de dos semanas de cultivo se detectó un nuevo compuesto, nygerone A (figura 2.4) (45). En *P. citreonigrum* se identificaron diez compuestos, entre ellos 6 azaphilone. Uno de

estos compuestos, una sclerotioramine, que presentó actividad frente a *Candida*. Se identificaron además dos nuevos meroterpenoides. (100). Asimismo se han aplicado inhibidores como butirato de sodio 100  $\mu\text{M}$  al hongo marino *Leucostoma persoonii*, y se obtuvo cytosporone R, un compuesto no descrito previamente (9).

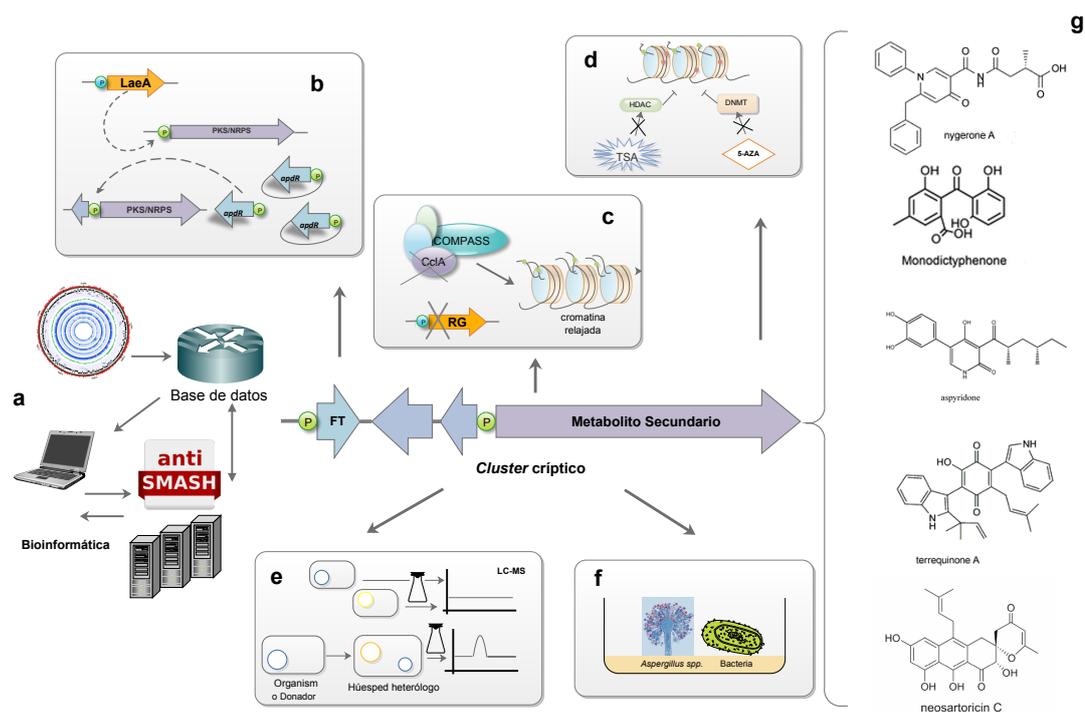
En 2013, a un hongo endófito proveniente de la planta medicinal *Datura stramonium*, se le agregó SBHA 500  $\mu\text{M}$ , en esta ocasión se produjeron dos nuevos compuestos de ácido fusárico (26). Investigadores en Taiwan utilizaron 5-aza 100  $\mu\text{M}$  en *Aspergillus sydowii*, identificándose tres nuevos compuestos sesquiterpenoides, los cuales mostraron actividades antidiabéticas y antiinflamatorias (28).

Christoph *et al.* (2013) manejaron por separado una variedad de inhibidores de butirato de sodio, 5-aza, TSA y ácido Valproico sobre *Aspergillus clavatus*, los inhibidores presentaron un aumento significativo en la producción de los MS citocalasina E y patulina (112). Recientemente en *Chaetomium cancroideum* se obtuvieron tres nuevos MS: chaetophenol G y cancolides A y B después de 14 días de cultivo, en esta oportunidad el compuesto utilizado fue nicotinamide 50  $\mu\text{M}$  (4).

### 2.6.4. Recreación de Hábitat

En la naturaleza los microorganismos como los hongos y bacterias coexisten en el mismo ambiente. En el ambiente terrestre se sabe que ocurre mayormente la conformación de consorcios entre bacterias y hongos (93). Partiendo de lo expuesto anteriormente sobre el hecho de que muchos de los MS en hongos no se expresan en condiciones de laboratorio habituales y en cambio se expresarían, para tener ventaja de supervivencia, en su hábitat natural; por lo que el recrear dichas condiciones (figura 2.4) se ha obtenido, por ejemplo, en *Fusarium tricinctum*, la producción de macrocarpon C y citreoisocoumarinol, tras realizar un co-cultivo en presencia de *Bacillus subtilis* (73). Ratab *et al.* (2013), cultivaron *A. fumigatus* con dos especies de *Streptomyces* por separado, y obtuvieron nuevos MS, como fumitremorgin C y spirotryprostatin B, un potencial fármaco anticancerígeno (82).

Es claro el gran potencial que tienen los hongos filamentosos, como una fuente incalculable e inexplorada para el descubrimiento de moléculas de interés industrial; por esta razón, los adelantos logrados en esta materia se encuentran en el camino de la continua mejora de técnicas novedosas, mas poderosas y rápidas. Una de estas



**Figura 2.4:** Diferentes estrategias en la minería genómica para conseguir la expresión de *clusters* silentes del metabolismo secundario. **a)** antiSMASH (antibiotics and Secondary Metabolite Analysis SHell) herramienta bioinformática para la predicción de *clusters* crípticos a partir de la secuenciación de genomas de hongos o bacterias. **b)** Sobreexpresión de reguladores globales (RG) como *laeA* y factores de transcripción específicos como *apdR*. **c)** Delección de genes implicados en regulación epigenética como *cclA* cuyo producto forma parte de COMPASS (complejo de proteína asociado con Set1) o delección de RG. **d)** Utilización de compuestos inhibidores de histonas desacetilasas (HDAC) como Tricostatina A (TSA) e inhibidores de ADN metiltransferasas (DNMT) como 5-azacitidina (5-aza). **e)** Método de expresión heteróloga, una célula normalmente no expresa un metabolito en concreto y al ser transferido el *cluster* críptico a otra célula se logra que se exprese. **f)** Simulación del hábitat, al someter un hongo a compartir cultivo con otras especies, este expresa compuestos no habituales. **g)** Moléculas novedosas obtenidas con las técnicas antes ilustradas.

vías, es el conocimiento sobre la regulación epigenética con sus distintos complejos y proteínas que se encuentran involucradas en la regulación de genes del metabolismo secundario, facilitado el acceso a los *clusters* silentes (104). En esta carrera están el esfuerzo coordinado de las diferentes disciplinas que incluyen la metabolómica y a su vez es complementada y se retroalimenta de la transcriptómica y proteómica.

### 2.7. Silenciamiento de Genes Mediante RNAi

Como se mencionó en la sección 2.6.2.1 el gen *cclA* fue deletado en *A. nidulans* y otras especies de este género, lográndose la activación de *clusters* de genes del metabolismo secundario y la producción de algunos compuestos nuevos. La delección de genes en hongos filamentosos conlleva un considerable trabajo ya que la recombinación homóloga es ineficiente. Una alternativa a este método es el silenciamiento mediante RNA de interferencia (RNAi), que resulta más sencillo y puede aplicarse con mayor rapidez. El mecanismo del RNAi consiste básicamente en la formación de un RNA de doble cadena (dsRNA) con una secuencia idéntica o muy similar a la del gen cuya expresión se pretende silenciar. Este dsRNA es procesado por la RNasa Dicer para dar fragmentos de 21-26 nucleótidos denominados siRNA (small interfering RNA). Las dos hebras del siRNA se separan entonces, y la que es complementaria al mRNA del gen que se quiere silenciar se une a este mRNA, guiando al complejo RISC (RNA-induced silencing complex) para que a través de la actividad RNasa de Argonauta se corte el mRNA en el lugar en que se ha formado el dúplex con la hebra del siRNA (95).

En hongos filamentosos se han encontrado los componentes de la maquinaria del RNAi en muchas especies pero no en todas (70) y se ha demostrado la existencia de silenciamiento por RNAi en varias especies, por ejemplo del género *Aspergillus* (7), en *Neurospora crassa* (69) y en *Penicillium chrysogenum* (52, 96).

# Planteamiento Principal

---

## 3.1. Justificación

A partir del descubrimiento del antibiótico  $\beta$ -lactámico penicilina en 1929, y el impacto que años más tarde tuvo en el tratamiento de infecciones bacterianas, dio comienzo la era de los antibióticos, iniciándose una intensa labor de búsqueda de compuestos naturales con actividad antimicrobiana, pero también compuestos con otras propiedades bioactivas, como por ejemplo antitumorales (11).

Los hongos filamentosos son uno de los grupos de organismos con mayor capacidad de producción de MS. Se conocen muchos detalles moleculares de la biosíntesis de MS en los hongos, como la agrupación en *clusters* de los genes biosintéticos y muchos aspectos de su regulación a nivel genético. La secuenciación completa de genomas de hongos filamentosos ha revelado la presencia de *clusters* “silentes”, es decir que no se expresan en condiciones de laboratorio y por tanto se desconoce qué compuesto sintetizan.

La minería genómica es un concepto nuevo surgido en la reciente era de la genómica, y consiste en la extracción de información nueva a partir de genomas y que tenga aplicación para el ser humano; en el contexto del metabolismo secundario, se centra en la detección de *clusters* de MS en el genoma y en la inducción de la expresión de los mismos para identificar y analizar el compuesto que sintetizan (86, 105). El hallazgo de nuevos compuestos naturales bioactivos es muy importante para, por ejemplo, contrarrestar la emergencia de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos actuales (85), además de buscar nuevos tratamientos para diversas enfermedades.

### 3. PLANTEAMIENTO PRINCIPAL

---

En este estudio aplicaremos algunas estrategias de minería genómica basadas en la remodelación de la cromatina para activar la expresión de *clusters* silentes en el hongo *P. chrysogenum*. En el genoma de este hongo se han detectado un total de 33 *clusters* del metabolismo secundario utilizando la herramienta bioinformática SMURF (98), pero se desconocen los productos sintetizados por muchos de ellos, los cuales son probablemente *clusters* silentes. También realizaremos un análisis bioinformático mediante antiSMASH para detectar nuevos *clusters* de metabolismo secundario en *P. chrysogenum*, todo ello con el objetivo de tratar de identificar nuevos compuestos producidos por este hongo.

## 3.2. Hipótesis

Al igual que en otros hongos, el metabolismo secundario en *Penicillium chrysogenum* está regulado a nivel epigenético por la disposición de la cromatina. La aplicación de compuestos que inhiben enzimas participantes en la remodelación de la cromatina, y asimismo el silenciamiento por RNAi del gen *cclA*, cuyo producto forma parte del complejo remodelador de la cromatina COMPASS, provocarán cambios en el perfil de metabolitos secundarios producidos por el hongo, con la posible producción de compuestos no identificados previamente. En el terreno de la bioinformática, la aplicación de la herramienta antiSMASH al genoma de *Penicillium chrysogenum* podría detectar *clusters* del metabolismo secundario no identificados previamente por otros programas como SMURF.

## 3.3. Objetivo General

Como objetivo general, utilización de estrategias de minería genómica en *P. chrysogenum* para el hallazgo de nuevos *clusters* de metabolismo secundario en su genoma y para obtener cambios en el perfil de metabolitos secundarios producidos

### 3.3.1. Objetivos Específicos

- ⊗ Utilización de compuestos remodeladores de la cromatina, (tricostatina A y 5-azacitidina) en cultivos de *P. chrysogenum* y análisis de la producción de metabolitos secundarios
- ⊗ Clonación del gen *cclA* de *P. chrysogenum*
- ⊗ Transformación de *P. chrysogenum* para atenuar el gen *cclA* mediante RNAi
- ⊗ Aplicación del *software* bioinformático antiSMASH para la predicción de *clusters* del metabolismo secundario



# Materiales y Métodos

---

## 4.1. Equipos

Los Equipos empleados para este trabajo fueron:

Autoclave (All American)  
Balanza analítica (Sartorius BP221S)  
Balanza granataria (Ohaus® y Adam Equipment)  
Baño termostático (LAB-LINE AQUABATH)  
Cámaras de electroforesis: (Apollo instrumentation 75.710.)  
Cámara de Neubauer (Boeco)  
Centrífuga refrigerada (Eppendorf 5417 R)  
Campanas de flujo laminar (VECO, S.A de C.V.)  
Campana de seguridad química  
Estufa (Binder)  
Espectrómetro de masas APCI/ESI-TOF (Bruker)  
Fuentes de poder PowerPac 300 (Bio-Rad)  
Gel DOC 2000 (Bio-Rad)  
Incubadora (New Brunswick Scientific G-24)  
Incubadora Orbital (INO- 650 V)  
Horno de microondas (SANYO)  
Microscopio óptico (Olympus CH30)  
Micropipetas (Gilson)  
Microcentrífuga (Eppendorf 5415 C)  
Parrillas con agitación magnética (Thermolyne)  
Potenciómetro (Conductronic, 120)  
Sistemas de purificación de agua Milli-Ro y Milli-Q (Millipore)

Sonicador (Branson, 1210)  
Termociclador (Bio-Rad, T100<sup>TM</sup>)  
Thermomixer (Eppendorf, 5436)  
Transiluminador de luz UV (Bio-Rad)  
UltraHPLC marca Dionex (Thermo Scientific)  
Ultracentrífuga (AVANTI 30 BECKMAN)  
Ultracongelador -20°C (Revco)  
Ultracongelador -70°C (Forma Scientific)  
Vórtex Maxi Mix<sup>®</sup> (Thermo Scientific Thermolyne)

### 4.2. Microorganismos

#### 4.2.1. Cepas Bacterianas

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Cepa inocua, habitualmente utilizada para las técnicas de transformación y amplificación de ADN plasmídico, gracias a su alta eficiencia de transformación de células competentes (hasta  $1 \times 10^8$  transformantes /  $\mu\text{g}$  de ADN). Esta cepa posee una delección en el gen *lacZ* del operón *lac*, por lo que es posible la selección por  $\alpha$ -complementación produciendo una coloración azul de la colonia.

Esta cepa bacteriana se aprovechó para la amplificación de las construcciones plasmídicas. Su crecimiento se realizó en medio LB líquido y sólido, complementado con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a 37°C durante 16 h. Cuando crecieron colonias transformantes resistentes a dicho antibiótico, se procedió a almacenar las cepas transformadas debidamente etiquetas, en glicerol al 40%(v/v) a -20°C.

#### 4.2.2. Cepas Fúngicas

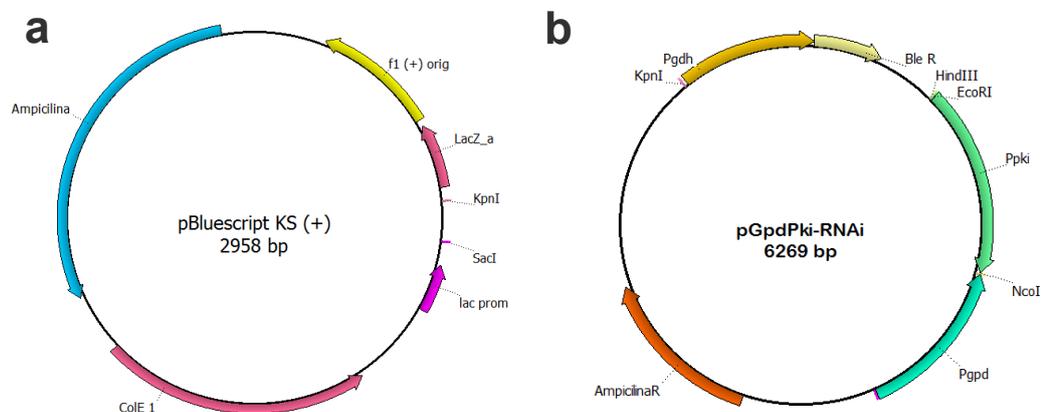
*Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (ATCC 28089).  
Cepa silvestre, aislada de un melón del mercado de Peoria, Illinois. (71, 81).

### 4.3. Vectores Plasmídicos

pBlueScript KS-SK (+/-).  
Plásmidos derivados del pUC19, de Stratagene, compañía adquirida por Agilent Tech-

nologies Inc (2007). Contienen un fragmento del gen *lacZ*, capaz de complementar la mutación presente en la  $\beta$ -galactosidasa en cepas de *E. coli* con la deleción *lacZ* $\Delta$ M15, lo que permite la aparición de color azul en la colonia. Este plásmido posee un sitio de clonación múltiple, con cortes únicos para 21 enzimas de restricción, facilitando así la integración de insertos. En cambio si el inserto interrumpe la región del gen *lacZ* producirá colonias bacterianas de color blanco. Cuenta también con un gen *bla* de resistencia al antibiótico  $\beta$ -lactámico ampicilina, posibilitando la selección de transformantes que se desarrollen en presencia de dicho antibiótico; este plásmido posee un tamaño de 2.958 pb.

La convención KS o SK se emplea para indicar la orientación del sitio múltiple de clonación, en el caso de KS es dirección 5'-KpnI...SacI-3', respecto al extremo 5' del gen *lacZ* y en el SK la orientación es la contraria (5'-SacI...KpnI-3').



**Figura 4.1:** Mapa circular de plásmidos empleados en este trabajo. Se indican los nombres, tamaños, enzimas de restricción con corte único, marcadores de resistencia y promotores. a) Vector comercial pBluescript<sup>®</sup>. b) Vector pGpdPki-RNAi.

### **pGpdPki-RNAi** Marcial-Quino (64).

Plásmido derivado del pJL43b1 (40), posee un tamaño de 6269 pb. Este plásmido está constituido por un promotor *Pgpd* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) de *Apergillus nidulans* y el promotor *Ppki* (piruvato quinasa) de *Aspergillus niger* en orientación opuesta y enfrentados, espaciado por el único sitio de restricción para *NcoI*. El objetivo de la presencia de los dos promotores es la generación de un dsRNA a partir de un fragmento de un gen cuya expresión se quiera silenciar. Posee un marcador de resistencia bacteriana a ampicilina, Asimismo posee un *cassette* de resistencia a fleomicina que se emplea como marcador de selección en hongos. Este plásmido fue empleado para insertar un fragmento del gen *cclA* y silenciar su expresión.

## 4.4. Antibióticos

### **Ampicilina:**

Se adquirió de laboratorios Amsa. Se preparó una solución en agua inyectable con una concentración final de 100 mg/mL, luego fue esterilizada por filtración a través de una membrana Millipore<sup>TM</sup> de 0.22  $\mu\text{m}$ . Por último esta solución se distribuyó en alícuotas y se mantuvo almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Se empleó en la selección de colonias transformantes de *E. coli*.

### **Fleomicina:**

Fue suministrada en polvo por InvivoGen. Se preparó una solución de 20 mg/mL con agua inyectable. Se esterilizó por filtración en una membrana Millipore<sup>TM</sup> de 0.22  $\mu\text{m}$ . Se hicieron alícuotas y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Fue utilizada para la selección de transformantes de *P. chrysogenum* NRRL 1951.

## 4.5. Enzimas de Uso Comercial y Otros

Las enzimas de restricción, fosfatasa alcalina FastAp<sup>®</sup> (thermosensitive Alkaline Phosphatase), y las enzimas *Taq* ADN Polimerasa recombinante y T4 DNA ligasa fueron proporcionadas por Thermo Scientific<sup>®</sup>. La enzima polimerasa *PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase*<sup>®</sup> se obtuvo de Agilent Technologies, Inc. La  $\beta$ -glucuronidasa, las enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* y el Dithiothreitol (DTT) fueron utilizados en la obtención de protoplastos, se adquirieron de Sigma-Aldrich, Inc.

## 4.6. Compuestos remodeladores de la cromatina

### Tricostatina A (TSA)

La Tricostatina A fue adquirida en Sigma-Aldrich, Inc. Producido por *Streptomyces* *sp* inhibe las histonas desacetilasas (HDAC) en concentraciones nanomolares lo que acarrea un aumento de la acetilación de histonas, contribuyendo así a la activación transcripcional. (67)

### 5- azacitidina (5-aza)

El 5- aza, distribuido por Sigma-Aldrich, Inc. es un inhibidor de las DNA metiltransferasas (DNMT), es un análogo químico de citidina. Cuando este análogo se integra en las cadenas de ADN en crecimiento, bloquea la metilación de citosina por la inhibición no competitiva de las enzimas ADN metiltransferasa que normalmente metilan al ADN (42).

## 4.7. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la Unidad de Servicio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. En la tabla 4.1 se describen los oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia
cclA-F	<u>AGGATCC</u> CAGAATCAAATCGGCAAGGTTGGTA
cclA-R	AGAAT <u>TCC</u> CACACCGTTCATTCCGTCTCTC
cclA-RNAi-F	AAGCCATGGGCACTTACGATCCTGCCGATAATAC
cclA-RNAi-R	CCCACCATGGACCCTCAAATC
Ble-tr1-F	AAGTTGACCAGTGCCGTTCC
Tcyc-tr1-R	AGGGACCTAGACTTCAGGTTGTC
pki(gdp)-F	TCTCTCTTCTCTCGCTCAC
gpd (pki)-R	TACTCCATCCTTCCCATCC
cclA(pki)-R	CAGGCGGCAAGAAAGCATAGA

**Tabla 4.1:** Listado de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Se indica el nombre, la secuencia (5' a 3'). Los sitios de corte para enzimas de restricción original se señalan en subrayado.

### 4.8. Sistemas Comerciales (Kits)

#### **Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification.**

Se adquirió de Promega, está diseñado para el aislamiento de ADN genómico, el procedimiento se basa en un proceso de cuatro pasos; lisis de nucleos, precipitación de proteínas, precipitación de ADN y rehidratación. Empleada en la cepas fúngicas.

#### **Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up System.**

Sistema de minicolumnas con resina de Promega, utilizadas para la purificación, aislamiento y concentración de productos de PCR y fragmentos de ADN en geles de agarosa.

### 4.9. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución-Espectrometría de Masas (LC-MS)

Los equipos que prestaron su servicio fueron:

Espectrómetro de masas APCI/ESI-TOF marca Bruker, modelo MicroTOF-II- Focus<sup>TM</sup>  
Acoplado a equipo UltraHPLC marca Dionex, modelo UltiMate<sup>®</sup> 3000

#### 4.9.1. Columnas para Cromatografía Líquida de Alta Resolución UltraHPLC

Las columnas utilizadas para el UltraHPLC fueron: columna analítica Poroshell 120 EC C18 de 2.7  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y dimensiones 4.6 X 50 mm, y la columna analítica zorbax SB C-18 de 3.5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y dimensiones 2.1 X 100 mm. Las dos columnas son de la casa comercial Agilent Technologies.

### 4.10. Programas Utilizados

#### 4.10.1. Software de Bioinformática

##### 4.10.1.1. antiSMASH

antiSMASH (65) es un servidor *web* de libre acceso, o puede ser descargado el software de su sitio web. Con esta herramienta bioinformática se puede identificar,

anotar, y comparar grupos de genes que codifican para la biosíntesis de metabolitos secundarios en genomas de hongos y bacterias. El *software* fue utilizado para analizar el genoma *P. chrysogenum* NRRL 1951. La versión que se utilizó fue antiSMASH 3.0.5 (101).

#### 4.10.2. Software para Análisis de Espectros LC-MS

##### 4.10.2.1. MZmine2

MZmine2 (78) es un *software* de código abierto para el procesamiento de datos de espectrometría de masas, gestionando la salida de datos principalmente de LC-MS. Basado en una caja de herramientas que contiene todos los métodos para el procesamiento de datos de análisis diferencial.

### 4.11. Medios de Cultivo

#### 4.11.1. Medios de Cultivo para Bacterias

LB o Luria-Bertani Medio de cultivo para <i>E.coli</i> ; Miller, 1972 (66) (g/L)	
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
<i>NaCl</i>	10
pH	7.5

Para emplearlo como medio sólido se añadieron 20 g de agar Bacteriológico por litro. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°C.

#### 4.11.2. Medios de Cultivo para Hongo

Medio Czapek, medio mínimo de crecimiento, usa <i>NaNO<sub>3</sub></i> como única fuente de Nitrógeno (77, 90) (g/L)	
Sacarosa	30
<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	0.5
<i>NaNO<sub>3</sub></i>	2
<i>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</i>	0.5
<i>FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</i>	0.01
Agar	20
pH	7

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

El Medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min. Cuando se utilizó para la regeneración de protoplastos de *P. chrysogenum* NRRL 1951, este medio fue suplementado con Sorbitol (1 M) como estabilizador osmótico.

Medio MDIP medio definido de <i>P. chrysogenum</i> (24) (g/L)	
Solución A:	
Ácido cítrico	10
Ácido acético	2.5
Etilamina	3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.01
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.01
CoSO <sub>4</sub>	0.005
NaCl	0.001
Agua destilada	0.8
pH	5.5
Solución B:	3
Glucosa	50
Agua destilada	0.1

Las soluciones A y B se esterilizan por separado a 121°C por 15 min y se mezclan antes de su uso (10 ml de solución B por cada 90 ml de solución A).

Medio MDFP. Medio definido de producción de <i>Penicillium</i> (g/L)	
Solución A	
Solución B	Solución MDI
	Lactosa 30
	Agua destilada 0.1
Solución C	
	Sacarosa 10
	Agua destilada 0.1

Las soluciones A, B y C se esterilizan por separado y se mezclan antes de su uso. Para 80 ml de medio MDFP se añaden 10 ml de solución B y 10 ml de solución C.

<i>Medio Potato Dextrose Broth</i> (PDB) BD Difco <sup>tm</sup> . Medio para el cultivo de levaduras y hongos filamentosos	
Infusión de 200 g de patata	4 g
Dextrosa	20 g
pH	5.1

Se disolvieron 24 g del medio en 1 litro de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

Medio <i>Power</i> (PW) Medio de esporulación y mantenimiento para <i>P. chrysogenum</i> , el cual consiste en una fusión de los medios PM1 (62) y Czapek-KCl 0,7 M (g/L)	
Sacarosa	25
lactosa	5
Peptona	2.5
Sólidos de maceración de maíz	0.5
<i>KCl</i>	2
<i>NaCl</i>	1
<i>NaNO<sub>3</sub></i>	1.5
<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	0.25
<i>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</i>	0.25
Sales PW	0.01
pH	6.75

Se añadió agar en una concentración del 2,0% (p/v). Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

Sales PW (g/L)	
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	6
<i>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</i>	1
<i>FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O</i>	0.4
<i>CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</i>	0.2

Se completó el volumen hasta 200 ml con agua destilada. El precipitado formado se resuspendió por agitación antes de su uso.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Medio MPPY Medio de germinación y crecimiento para <i>P. chrysogenum</i> (modificado de Anné, 1977)(3) (g/L)	
Glucosa	40
$NaNO_3$	3
Extracto de levadura	2
$KCl$	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01
pH	6

Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

### 4.12. Métodos de cultivo de *P. chrysogenum*

#### 4.12.1. Cultivo y Mantenimiento de *P. chrysogenum* NRRL 1951

El crecimiento y esporulación de *P. chrysogenum* NRRL 1951 se efectuó en medio sólido, empleando el medio Power (PW), fue incubado a 28°C de 4 a 6 días, luego se procedió a la recolección de esporas con la ayuda de una solución para esporas (NaCl 0.9 % (p/v) y tween al 0.1 % (v/v) ). Para el crecimiento en medio líquido se utilizó 50 mL del medio MPPY en matraces 250 mL con agitación orbital a 250 rpm.

Para preservar la cepa fúngica durante períodos prolongados, se tomaron y propagaron las esporas provenientes de una colonia aislada de crecimiento y esporulación rápida que conservó las características macroscópicas de una colonia aterciopeladas de color verde oscuro rodeado por un halo blanco, y al microscópico el conidióforo ramificado con racimos de fiálides y esporas esféricas. Luego se realizó la liofilización de conidios suspendidos en leche descremada contenidos en ampollita y se conservó a temperatura ambiente, o bien en suspensión de esporas en glicerol al 40 % (v/v) almacenadas a -20°C, contenidas en un vial. En períodos más cortos, menos de un mes, se procedió manteniendo a 4°C la siembra de esporas recientes en placas de Petri con medio PW selladas con papel parafilm M®.

#### 4.12.2. Condiciones de Crecimiento para la Preparación de Inóculo

Se sembraron masivamente 30  $\mu$ L de *P. chrysogenum* procedentes de un stock de almacenamiento en glicerol al 40 % (v/v) en medio PW a 28°C durante 5 días, las esporas se recolectaron con solución para esporas, con la ayuda de un varilla roma de

vidrio estéril y fueron depositadas en un tubo falcon estéril. Luego se realizó en conteo de esporas con la ayuda de la cámara de Neubauer.

### 4.12.3. Cultivo en Medio Líquido Incorporando Remodeladores de la Cromatina

#### 4.12.3.1. Cultivo en Medio Líquido Complejo PDB y Definido MDFP

Se inóculo con una concentración final de  $1 \times 10^7$  esporas/mL. de *P. chrysogenum* en 50 mL de medio líquido PDB o MDFP contenidos en un matraz de 250 mL, incubándose a 28°C con agitación orbital de 150 rpm durante 16 días. Después de las primeras 24 h se agregó el respectivo inhibidor. El experimento se llevó a cabo por duplicado y con un control negativo adicionándole solo DMSO.

La concentración del inhibidor 5-aza aplicada al medio MDFP con *P. chrysogenum* fue de 250  $\mu\text{M}$ , en el caso del inhibidor TSA se trabajó con 0.25  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  respectivamente. Para el cultivo de *P. chrysogenum* en medio complejo PDB se agregó el inhibidor TSA a concentraciones finales de 0.25  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  y para el inhibidor 5-aza de 50  $\mu\text{M}$  y 250  $\mu\text{M}$ .

Los matraces con medio adicionado con 5-aza se cubrieron de la luz, para mantener la estabilidad del inhibidor. Posteriormente se recuperó el sobrenadante por centrifugación y almacenó a -70°C hasta su extracción.

#### 4.12.4. Separación del Caldo de Cultivo

Concluido el tiempo de los experimentos donde se adicionaron los inhibidores 5-aza o TSA, a medios de cultivo líquidos (PDB o MDFP) de *P. chrysogenum*, de los cuales, se recuperó el sobrenadante y se extrajo la fase orgánica siguiendo esta metodología:

i. Consiste en separar el micelio del caldo mediante centrifugación a  $\approx 13500 \times g$  durante 20 min a 4°C.

ii. A continuación se filtra con nailon “nytal” de 30  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, el sobrenadante para terminar de separar el micelio, el caldo fue almacenado en un tubo falcon estéril.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

iii. El caldo de cultivo se extrae tres veces en un embudo de separación con una mezcla de acetato de etilo:cloroformo:metanol 3:2:1 . El extracto resultante se deja evaporar con la ayuda de una campana de extracción a presión reducida.

iv. Luego se resuspende en 500  $\mu$ L de metanol contenido en un tubo estéril y fue almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Antes de inyectar la muestra en el LC-MS se filtra con una membrana Millipore<sup>TM</sup> de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

### 4.13. Análisis de las Muestras por LC-MS

Los extractos filtrados previamente fueron inyectados en columnas C18 donde se aplicó un gradiente lineal (agua: acetonitrilo) y luego pasaron al espectrómetro de masas en ionización ESI en modo positivo con un flujo de 0.3 mL/min. Las muestras a las que se aplicó 5-aza y TSA en la concentración 0.25  $\mu\text{M}$  se inyectaron en una columna Poroshell 120 EC C18 (4.6x 50 mm 2.7 $\mu\text{m}$ ), con un flujo isocrático, la cual fue de 0 a 10 min a 5% de acetonitrilo, del minuto 10 a 50 un gradiente lineal hasta llegar a 90% de acetonitrilo, y del minuto 50 a 65 un flujo isocrático a 90% de acetonitrilo, para un tiempo total de 65 min. En el caso de las muestras tratadas con TSA para la concentración de 1  $\mu\text{M}$  se inyectaron en una columna Zorbax SB - C18 (2.1 x 100 mm 3.5 $\mu\text{m}$ ), con un flujo isocrático, de 0 a 10 min a un 5% de acetonitrilo, del minuto 10 a 40 un gradiente lineal hasta llegar a 90% de acetonitrilo, y del minuto 40 a 55 un flujo isocrático a 90% de acetonitrilo, para un tiempo total de 55 min.

### 4.14. Métodos de Extracción y Manipulación de ADN

#### 4.14.1. Obtención de ADN Genómico de *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951

La extracción de ADN genómico de *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 se realizó a partir de micelio, el cual se obtuvo de 30 ml de medio MPPY, este fue incubado a  $28^{\circ}\text{C}$  por 48 h , se recogió el micelio resultante por filtración con un filtro de nylon estéril de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro; o bien se centrifugó a  $\approx 1300 \times g$  durante 10 min, decantar el sobrenadante. El micelio fue lavado dos veces con un volumen de NaCl 0.9% (p/v), enseguida se secó con papel de filtro y se pasó a un mortero con nitrógeno líquido donde se maceró rápidamente; el micelio pulverizado se puso en un tubo Eppendorf ( $\approx$

25 mg) y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización. En adelante se procedió con las instrucciones del Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) siguiendo el protocolo de extracción para levaduras a partir de la adición la solución de lisis (*Nuclei Lysis Solution, NLS*).

#### 4.14.2. Extracción de ADN Plasmídico por Miniprep

El procedimiento seguido fue el descrito por Zhou *et al.* (110). Con esta metodología se obtuvo ADN plasmídico a pequeña escala. Para ello se seleccionaron colonias transformantes de interés al azar, provenientes de una placa de medio LB con ampicilina, antibiótico de selección del plásmido. Se sembraron masivamente las colonias seleccionadas con ayuda de un palillo estéril, en una placa LB con el mismo antibiótico, Se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  de 12 a 16 h. Se recogió del tubo eppendorf un pellet de células con un palillo estéril y se resuspendió en  $50\ \mu\text{L}$  de agua estéril, a continuación se adicionaron  $300\ \mu\text{L}$  de Buffer TENS<sup>1</sup> y se resuspendió con un vórtex durante 2 – 5 s. Se adicionaron  $100\ \mu\text{L}$  de acetato de sodio 3.0 M, pH 5.2, y se resuspendió nuevamente con un vórtex de 2 – 5 s. Se centrifugó a  $16.000\ \times\ g$  durante 2 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf de 1.5 mL. Se adicionaron  $900\ \mu\text{L}$  de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 2 min a  $16.000\ \times\ g$  y se retiró el sobrenadante. El pellet se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70 % (v/v), se centrifugó durante 2 min a  $16.000\ \times\ g$  y se retiró el sobrenadante. El botón se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min aproximadamente, el ADN plasmídico se resuspendió con 50 – 100  $\mu\text{L}$  de agua estéril libre de ADNasas. Se analizaron 8  $\mu\text{L}$  de la muestra en un gel de agarosa al 1 % (p/v), luego se requirió de 1 – 5  $\mu\text{L}$  de cada minipreparación para realizar los ensayos de restricción pertinentes.

#### 4.14.3. Extracción de ADN Plasmídico a Gran Escala: Megaprep

En esta ocasión se deseó obtener mayor cantidad de ADN plasmídico para esto se inocularon 50 –100 mL de medio LB con antibiótico de selección del plásmido con la cepa transformante, y se incubó de 12 a 16 h a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación constante de 200 rpm. Se recuperaron las células por centrifugación a  $\approx 2200\ \times\ g$  durante 10 min a temperatura ambiente (en tubos de 50 mL), decantando el medio. Se resuspendió el pellet celular con 4 mL de Buffer P1<sup>2</sup>, 10 mM EDTA (pH 8). Se adicionaron 4 mL de

---

<sup>1</sup>TENS: 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8), 0.1 N NaOH, 0.5 % (p/v) SDS.

<sup>2</sup>Buffer P1: 50 mM Tris-HCl (pH 8).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Buffer P2<sup>3</sup>, y se mezcló completamente por inversión suave de 4 - 6 veces. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min. A continuación se le adicionaron 4 mL de Buffer P3<sup>4</sup>, se mezcló por inversión 4 - 6 veces, y se mantuvo en hielo durante 15 min. Se centrifugó a  $\approx 2200 \times g$  por 30 min, y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Luego se adicionaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3.0 M, pH 5.2 y 3 volúmenes de etanol absoluto. El ADN plasmídico se dejó precipitando a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Se centrifugó a  $\approx 2200 \times g$  durante 30 min y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se lavó el botón con 1 mL de etanol al 70 % (v/v), y se transfirió la suspensión a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Después se centrifugó a  $\approx 14800 \times g$  durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 500  $\mu\text{L}$  de agua estéril libre de ADNasas. Posteriormente se le adicionó ARNasa<sup>5</sup> (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Como último paso se agregó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (Sigma Aldrich Co.) y se mezcló por inversión brevemente hasta formar una emulsión. Se centrifugó a  $\approx 14800 \times g$  por 5 min a temperatura ambiente para separar la fase acuosa de la fase orgánica. La fase acuosa (superior) fue transferida a un tubo nuevo. Se repitió el procedimiento anterior desde la adición de fenol. Se retiraron los restos de fenol agregando un volumen de cloroformo. Se centrifugó a  $\approx 14800 \times g$  por 5 min y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL. Finalmente el ADN plasmídico se precipitó con etanol 70 % (v/v) y se centrifugó 2 min a  $\approx 14800 \times g$ . El pellet resultante se secó a temperatura ambiente y se resuspendió con 50  $\mu\text{L}$  de agua estéril libre de ADNasas. Finalmente se analizaron 8  $\mu\text{L}$  de la muestra en un gel de agarosa al 1 % (p/v).

### 4.14.4. Digestión de ADN con Endonucleasas de Restricción

Se realizaron digestiones con endonucleasa de restricción para efectuar cortes específicos en fragmentos de ADN producto de PCR y plásmidos para construcción de vectores de interés. También se emplearon las enzimas de restricción para el análisis y verificación de las construcciones plasmídicas. Cada una de las reacciones con enzimas de restricción se llevó a cabo con las especificaciones descritas por el proveedor, ya que cada enzima requirió determinadas condiciones. Posteriormente las reacciones se limpiaron con ayuda del kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR clean-Up System (Promega<sup>®</sup>). Las

---

<sup>3</sup>Buffer P2: 200 mM NaOH, 0.5 % (p/v) SDS.

<sup>4</sup>Buffer P3: 3.0 M Acetato de sodio pH 5.2.

<sup>5</sup>ARNasa 10 mg/mL. Se disuelve en Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y NaCl 15 mM. Hervir durante 15 min, se enfría lentamente, se reparte en alícuotas y se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-70^{\circ}\text{C}$ . Cuando se especifica por el proveedor, la ARNasa puede diluirse directamente en  $H_2O$  destilada estéril a 10 mg/mL sin necesidad de tratamiento alguno, conservándose a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-70^{\circ}\text{C}$ .

digestiones de ADN resultantes se analizaron en geles de agarosa 1 % (p/v).

#### 4.14.5. Desfosforilación de extremos 5' con Fosfatasa Alcalina

La desfosforilación fue utilizada para el plásmido pGpdPki-RNAi para evitar su recirculación en el momento que se realizó la ligación del inserto de interés, ya que este vector al ser tratado con la enzima de restricción *NcoI* en el sitio de destino del inserto presenta extremos 5' protuberantes que pueden religarse. Para evitar recircularizaciones en la ligación del plásmido con el inserto se empleó la enzima recombinante FastAp<sup>®</sup> thermostable Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific<sup>®</sup>), que cataliza la hidrólisis de los grupos 5' fosfato en los extremos del plásmido digerido, evitando así su recircularización, esto debido a que la ADN ligasa necesita indispensablemente un extremo 5' fosforilado para la formación del enlace fosfodiéster (84). Luego de realizada la reacción bajo las indicaciones del fabricante no fue necesaria la purificación de esta, antes de llevar a cabo la ligación correspondiente.

#### 4.14.6. Ligación de Fragmentos de ADN

Para la clonación de productos de PCR previamente digeridos y ligarlos al respectivo plásmido igualmente digerido se utilizó con ADN ligasa del bacteriófago T4 (Thermo Scientific<sup>®</sup>) siguiendo las instrucciones del proveedor. Después las reacciones fueron incubadas a 22°C de 5 a 30 min y rápidamente se tomaron hasta 10  $\mu$ L de la mezcla para seguir la transformación de *E. coli*.

#### 4.14.7. Transformación de *E. coli*

Se realizó el método de transformación por choque térmico para ello se utilizaron células ultracompetentes de *E. coli*, siguiendo el protocolo descrito por Inoue *et al.*, (1990) y Hengen, (1996) (44, 51).

Se procedió a tomar 50  $\mu$ L de células ultracompetentes y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se adicionaron 10  $\mu$ L de plásmido, se resuspendió con suavidad y se mantuvo en hielo durante 30 min. Se pasó la mezcla a un baño de agua a 42°C durante 2 min y rápidamente fue enfriado en hielo. Se adicionaron 800  $\mu$ L de medio LB, se mezcló por inversión, en seguida se incubó a 37°C durante 1 h. Finalmente fue sembrada una alícuota de 100  $\mu$ L sobre una placa con agar LB y con el antibiótico de selección, en este caso ampicilina. Se incubó de 12 – 16 h a 37°C.

### 4.14.8. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Electroforesis de ADN en geles de agarosa, es una técnica utilizada para separar fragmentos de ácidos nucleicos en base a su tamaño, bajo un campo eléctrico en geles de agarosa o poliacrilamida, se empleó durante este trabajo agarosa en concentraciones entre 0.6 % y 2 % (p/v), la agarosa fue disuelta en amortiguador TAE<sup>6</sup> 1X con la ayuda de horno microondas, después se agregó el colorante Gel Red<sup>®</sup> para la tinción de ácidos nucleicos, disolviéndose 0.1  $\mu$ L por cada 35 mL de agarosa disuelta, y se vertió en el molde hasta su polimerización. Paralelamente las muestras de ADN se mezclaron con el amortiguador de carga 6X<sup>7</sup> en un volumen necesario para obtener una concentración de 1X. En seguida se sumergió el gel en TAE 1X y se cargaron las muestras de ADN junto con el marcador de peso molecular adecuado (1 kb, Promega<sup>®</sup> ó 100 bp O'rangeRuler de Thermo Scientific<sup>®</sup>). Se aplicó un voltaje de 10 V/cm de gel durante 45 a 90 min, dependiendo de la dimensión del gel. Finalmente se fotodocumentó con el equipo Gel Doc EZ Imager (BioRad<sup>®</sup>).

### 4.14.9. Extracción de ADN de Geles de Agarosa

Para la extracción de ADN de geles de agarosa se empleó el kit comercial de purificación Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega<sup>®</sup>. Antes de utilizar el kit previamente se separó el ADN mediante electroforesis, se cortó la banda de interés del gel procurando separar la menor cantidad de agarosa posible. En seguida se procedió con el protocolo recomendado por el proveedor.

### 4.14.10. Cuantificación de Ácidos Nucleicos

Las muestras de ADN se cuantificaron por espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>). Antes que se iniciara la medición de las muestras se pasó un blanco, es decir, la sustancia en la cual se encuentre el ADN resuspendido (agua destilada estéril o TE) para restar interferencia, luego se procedió con las muestras y su medición a absorbancias en longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm. Después se analizaron los cocientes A260/A280 y A260/A230 utilizando los siguientes criterios:

---

<sup>6</sup>TAE 50X: Tris base 242 g, ácido acético glacial 57.1 mL, EDTA 0.5 M pH 8.0 100 mL. Agua destilada hasta 1 litro.

<sup>7</sup>Amortiguador de carga 6X: Azul de bromofenol al 0.25 % (p/v), sacarosa al 40 % (p/v), xilenocianol al 0.25 % (p/v). Se esteriliza y se conserva a 4° C.

- ⊗ Una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde aproximadamente a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ADN de doble hebra.
- ⊗ Es posible estimar el grado de impurezas de origen proteico a partir del cociente A260/A280 el cual para el ADN debe ser cercano a 1.8 si se encuentra libres de impurezas. Cocientes menores se deben a contaminación por proteínas, fenol o material insoluble.
- ⊗ La muestra puede resultar con residuos contaminantes como hidratos de carbono, fenoles y péptidos entre otros, el cociente A260/A230 debe ser mayor que 2 y menor que 2.4 para ADN. Cocientes menores se deben a contaminación por una sal de guanidina o por  $\beta$ -mercaptoetanol.

#### 4.15. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Este método desarrollado por Kay Mullis en 1986 (68). La PCR amplifica exponencialmente una secuencia específica de ADN sintetizando grandes cantidades de un segmento específico de ADN de muy pequeñas cantidades de ADN molde. En este estudio se utilizó la PCR para la amplificación de secuencias genómicas y plasmídicas. Se empleó la enzima *Taq DNA Polymerase, Recombinant* (Thermo Scientific) proveniente del microorganismo *Thermus aquaticus* y *PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase* (Agilent Technologies). Las condiciones de reacción y de operación del termociclador se muestran en las tablas 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 respectivamente. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa entre 0.8 y 1.8 % (p/v).

Reactivo	Concentración final	Volumen final ( $\mu\text{L}$ )
$H_2O$ estéril	— 0 —	34
Reacción de Amortiguador (10X)	1X	5
Mezcla de dNTP (10 mM)	200 $\mu\text{M}$	1
iniciador F (20 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{M}$	2.5
iniciador R (20 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{M}$	2.5
ADN molde ( $\approx 25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ )	100 ng	4
<i>PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase</i>	2.5 U/ $\mu\text{l}$	1
Volumen de reacción		50

**Tabla 4.2:** Mezcla de reacción para PCR con *PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase*.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Reactivo	Concentración final	Volumen final ( $\mu\text{L}$ )
$H_2O$ estéril	— 0 —	31.5
Reaccion de Amortiguador (10X)	1X	5
$MgCl_2$ (25 mM)	1.5 mM	3
Mezcla de dNTP (10 mM)	200 $\mu\text{M}$	1
iniciador F (20 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{M}$	2.5
iniciador R (20 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{M}$	2.5
ADN molde ( $\approx 25$ ng/ $\mu\text{L}$ )	100 ng	4
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ )	1.25 U	0.5
Volumen de reacción		50

**Tabla 4.3:** Mezcla de reacción para PCR con *Taq* polimerasa

ciclos	Proceso	Temperatura	Tiempo	
30	Desnaturalización inicial	98°C	4 min	
	Desnaturalización	98°C	30s	
	Anillamiento	cclA	70°C	30s
		cclA-RNAi	72°C	30s
	Elongación	cclA	72°C	4 min
		cclA-RNAi		1 min
Elongación final	72°C	5 min		

**Tabla 4.4:** Condiciones de operación del termociclador de la PCR de los genes a analizar (*PfuUltra II Fusion*).

Ciclos	Proceso	Temperatura	Tiempo
30	Desnaturalización inicial	95°C	4 min
	Desnaturalización	95°C	30s
	Anillamiento	63 – 68°C	45s
	Elongación	72°C	1 min
	Elongación final	72°C	5 min

**Tabla 4.5:** Condiciones de operación del termociclador de la PCR de los genes a analizar (*Taq* polimerasa).

## 4.16. Transformación de *P. chrysogenum* por Protoplastos

En los siguientes protocolos, se tuvieron en cuenta los procedimientos descritos por Cantoral *et al.* (1987) y Queener *et al.* (1985)(23, 79).

### 4.16.1. Obtención de Protoplastos

Se Inocularon 100 mL de medio líquido MPPY para la cepa *P. chrysogenum* NRRL 1951 con conidios frescos procedentes de un cultivo masivo en una placa de Petri con medio PW, incubada a 28°C durante 4 a 6 días. Se Incubó en agitación orbital a 250 rpm y 28°C, durante 15 a 18 h, tiempo adecuado para que el tubo germinativo tenga una longitud media equivalente a unas 10-15 veces el diámetro de una conidia. El micelio fue recolectado por filtración a través de un filtro estéril de nailon (Nytal) de 30  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. A continuación se lavó dos veces con solución de lavado<sup>8</sup>. Se eliminó el exceso de líquido entre papeles de filtro estériles. Luego se pesó 1 g de micelio, fue transferido a un matraz liso estéril de 250 ml y resuspendido en 20 mL de tampón TPP<sup>9</sup>. Se Adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4$  1 M y 200  $\mu\text{L}$  de DTT<sup>10</sup> 1 M. Se incubó la solución a 28°C durante 1 a 2 h en agitación orbital a 80 rpm. Fue colectado el micelio por filtración en Nytal (como en el paso anterior). En un tubo de 15 mL, se preparon 10 mL de una solución de enzimas líticas (Sigma-Aldrich Chemical Co) disueltas en TPP, a una concentración de 14 mg/mL. La solución fue esterilizada por filtración mediante un filtro Milipore de 0,22  $\mu\text{m}$ . Se resuspendió el micelio en 10 mL de tampón TPP y se adicionó la solución anteriormente preparada, todo esto contenido en un matraz liso estéril de 250 mL. Se incubó la mezcla a 28°C con agitación orbital a 80 rpm durante 1 h. Después se adicionó  $\beta$ -glucuronidasa (Sigma Chemical Co) a una concentración final de 4.000 U/ml. Fue incubado bajo las mismas condiciones hasta la liberación de protoplastos<sup>11</sup>. Una vez que la mayoría de las hifas generaron y liberaron los protoplastos, se procedió a filtrar la suspensión a través de un filtro estéril de nailon de 3  $\mu\text{m}$ . El efluente resultante se transfirió a dos tubos estériles de 15 mL. A continuación se centrifugó a 800 x *g* durante 4 min. Se decantó y el

---

<sup>8</sup>Solución de lavado: NaCl 0,9 % (p/v); Tritón 0,01 % (v/v).

<sup>9</sup>TPP: Tampón fosfato potásico 50 mM; KCl 0,7 M; pH 5,80.

<sup>10</sup>El DTT permite reducir las uniones bisulfuro de la pared celular, facilitando la disgregación del micelio que suele crecer en grumos.

<sup>11</sup>Se verificó la liberación de protoplastos cada hora mediante muestreos periódicos al microscopio.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

botón fue resuspendido suavemente en 5 ml de tampón KCM<sup>12</sup> y se realizó un recuento del número de protoplastos obtenidos con la ayuda de una cámara de Neubauer. Se centrifugó a 800 x *g* durante 3 min y finalmente se resuspendió en tampón KCM a una concentración de protoplastos de 1-2 x 10<sup>8</sup> protoplastos/mL. Se mantuvo en hielo hasta la transformación.

### 4.16.2. Transformación de Protoplastos

La selección de transformantes se realizó en un medio de cultivo mínimo por cobertera, para este estudio el medio seleccionado fue Czapek junto con el estabilizador osmótico sorbitol (concentración final 1 M) para evitar el colapso de los protoplastos y suplementado con fleomicina a una concentración final de 25 a 30 µg/mL. Para la transformación se siguió el siguiente protocolo.

En un tubo de 15 mL, se realizó la mezcla de transformación:  
Solución de protoplastos (1x10<sup>8</sup> protoplastos/ml).....100 µL  
Tampón PCM<sup>13</sup> ..... 10 µL  
Solución de ADN (1-2 µg/µL).....5-10 µl  
Se mezcló suavemente con ayuda de una pipeta sin dejar burbujas.

En otro tubo se realizó una mezcla idéntica a la anterior, pero prescindiendo del ADN, se empleó como reacción control para determinar la capacidad de regeneración de los protoplastos, así como de la aparición de colonias revertientes. Las mezclas se incubaron en hielo durante 20 min. Luego se adicionaron 500 µL de tampón PCM y se mezcló suavemente. Se incubó a temperatura ambiente durante otros 20 min. Después se diluyó el polietilenglicol del tampón PCM de la reacción de transformación, agregando 600 µL de tampón KCM<sup>14</sup>. A continuación en un tubo de 15 mL se mezclaron, la reacción de transformación<sup>15</sup>, el agente de selección y el medio de cultivo fundido (a una temperatura de 48-50°C). Fue mezclado suavemente y se sirvió como cobertera sobre 5 mL de medio base<sup>16</sup> previamente preparado en placas 60 mm. Se dejó secar.

---

<sup>12</sup>KCM: KCl 0,7 M; CaCl<sub>2</sub> 50 mM; MES 10 mM, pH 5,80.

<sup>13</sup>Tampón PCM: Polietilenglicol 6000 50%; CaCl<sub>2</sub> 50 mM; MES 10 mM, pH 5,80.

<sup>14</sup>Siempre que se requiera hacer diluciones se realizarán en tampón KCM. En el caso de la reacción control, se hacen diluciones decimales seriadas para establecer el porcentaje de regeneración.

<sup>15</sup>La reacción de transformación se divide en varios tubos para ser sembrada en varias placas de petri o se diluye en series decimales, según el número de transformantes esperados.

<sup>16</sup>La composición de la base de medio de cultivo y la cobertera, es la misma.

Por último se incubó a 28°C durante 4 a 7 días hasta la aparición de las colonias transformantes.

#### 4.16.3. Selección de Transformantes

Las colonias transformantes que aparecieron durante el tiempo de incubación fueron resembradas por punción con la ayuda de un palillo estéril en placas de 60 mm de medio Czapek con 50 % más de concentración de fleomicina<sup>17</sup> que se empleó en la transformación de protoplastos, igualmente se emplearon controles positivos y negativos<sup>18</sup>. Se incubó durante 4 a 7 días a 28°C. Después fue tomada parte de la colonia, se sembró en placas de 60 mm con medio PW adicionando fleomicina, se sembró de forma masiva con ayuda de solución salina. Fueron incubadas a 28°C durante 4 a 7 días. Luego se recolectaron los conidios y se realizaron dilución en serie ( $10^{-1} - 10^{-6}$ ) en medio Czapek con fleomicina, con el fin de obtener colonias de transformantes homocariontes. Se incubaron durante 3 a 5 días a 28°C. Al tener colonias totalmente aisladas y de buen tamaño, se escogieron varias para ser resembradas por punción el centro en medio PW. Se incubó a 28°C de 4 a 6 días. Al tener la colonia homocariote se realizó un último pase al sembrar masivamente en placas de 90 mm en medio PW (sin fleomicina) para finalmente obtener un stock de esporas de trabajo y fueron almacenadas a -20°C con glicerol (40 % v/v).

### 4.17. Mecanismo de Silenciamiento del Gen *cclA* de *P. chrysogenum*

Para hacer uso de este mecanismo en *P. chrysogenum* NRRL 1951 se construyó un vector para silenciar el gen *cclA*, mediante RNA mensajero de interés, con ayuda de RNA de interferencia. El plásmido utilizado en este trabajo fue el pGpdPki-RNAi (64) descrito anteriormente (4.1). A este plásmido se le introdujo un fragmento del gen *cclA* justo entre los dos promotores.

El fragmento de interés se va encontrar flanqueado por los dos promotores en sentidos opuestos y encontrados entre sí, dando como resultado la formación RNA mensajeros complementarios entre sí y que hibridarán para dar lugar a RNA de doble

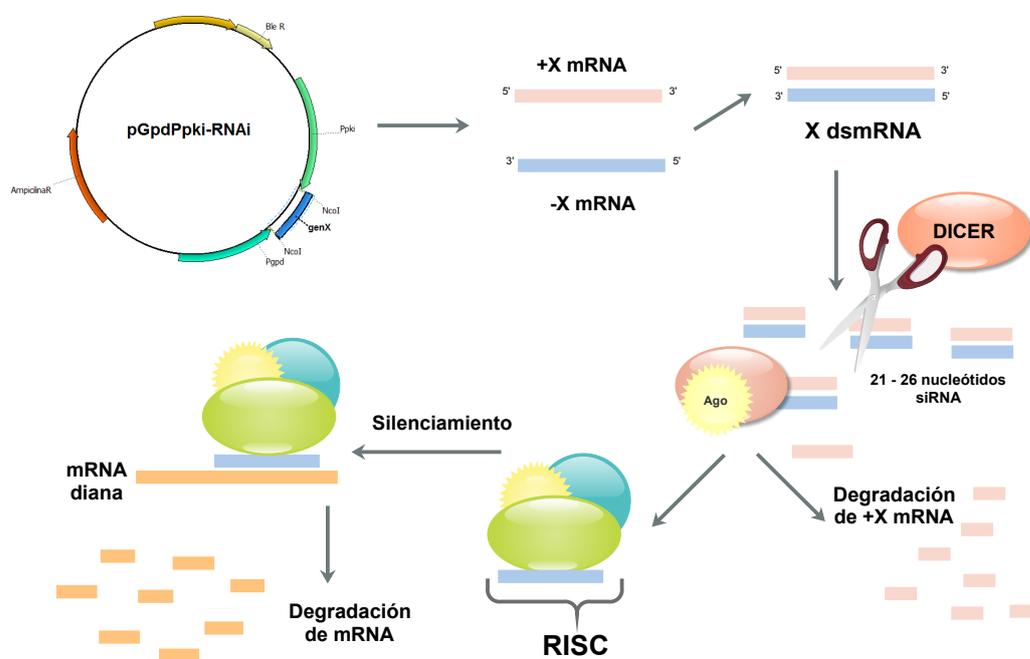
---

<sup>17</sup>Se empleó en adelante la misma concentración de fleomicina para adicionar al medio.

<sup>18</sup>Los controles se realizaron para cada pase de las colonias transformante con el agente de selección.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

cadena (dsRNA). En seguida la activación del proceso de silenciamiento inicia cuando el dsRNA es reconocido por Dicer (RNasa tipo III), que corta en fragmentos de 21-26 nucleótidos al dsRNA que son denominados como siRNA, luego el siRNA por acción de la enzima Argonauta libera la cadena complementaria que pasa al complejo RISC (RNA-induced silencing complex) el cual lo integran Argonauta y proteínas asociadas. El complejo RISC junto a la secuencia guía son capaces de degradar el ARN mensajero de interés ya que la secuencia guía es complementaria como se ilustra en la figura 4.2 (25, 30).



**Figura 4.2:** Mecanismo de silenciamiento por transcripción convergente. Donde se representa el RNA mensajero (mRNA), el RNA de doble cadena (dsRNA), la enzima argonauta (Ago) y el complejo RISC (RNA-induced silencing complex).

## 4.18. Predicción Bioinformática de *Clusters* Silentes del Metabolismo secundario

### 4.18.1. Datos de Entrada en antiSMASH (*Input data*)

El programa antiSMASH como servidor *web* presenta una única página de ingreso de datos. Se puede ingresar los datos en formato FASTA o datos genómicos en formato EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) y GenBank del NCBI. En este caso los datos fueron ingresados en formato EMBL. Como las secuencias analizadas fueron de un hongo, entonces se seleccionó la casilla de ADN de origen eucariota; la selección de este criterio es esencial para aplicar los correspondientes algoritmos de que dispone el programa para hacer una adecuada predicción. Luego vienen preseleccionadas una serie de opciones y además se pueden seleccionar otros criterios, dependiendo de lo que se requiera. Finalmente se envió el análisis. A continuación se desplegó una nueva ventana que muestra el estatus del análisis. Se tardó de 2 a 7 h en obtener los resultados.

### 4.18.2. Datos resultantes de antiSMASH (*Output*)

Finalizado el análisis de los datos se accedió directamente a su sitio *web* donde se desplegó una página de resultados donde se muestran los *clusters* identificados para las vías biosíntesis principalmente de PKS y NRPS, y se muestra la descripción del *clusters*, también se identificó la homología con otras especies, así como la predicción de una posible estructura. Todos los resultados generados por el programa pudieron ser descargados.



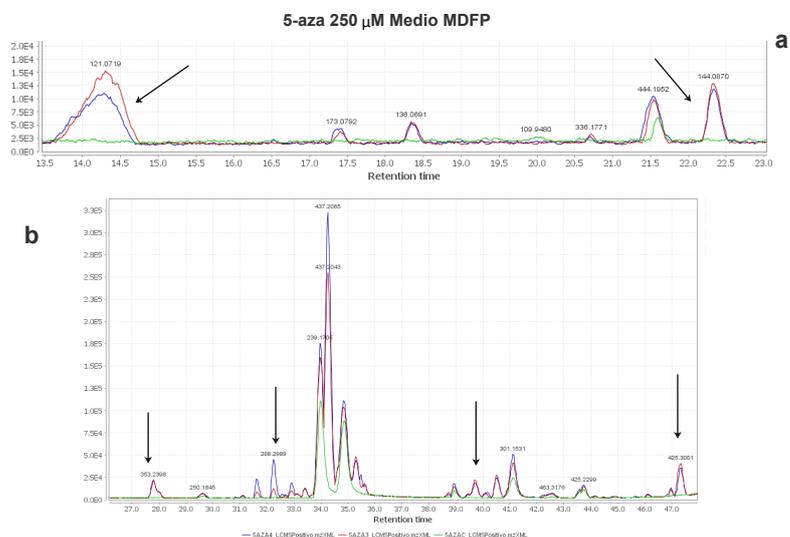
## 5.1. Análisis del Cambio en el Perfil de Metabolitos Inducido por el Remodelador de la Cromatina 5-azacitidina (5-aza)

### 5.1.1. Aplicación de 5-aza a Medios de Cultivo Líquidos de *P. chrysogenum*: MDFP y PDB

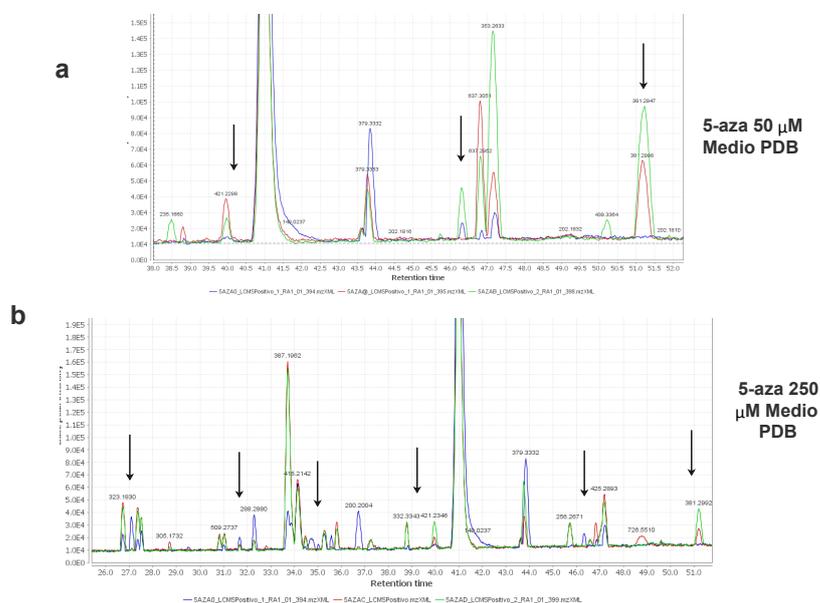
Las concentraciones de 5-aza empleadas fueron dos, en el medio complejo PDB se trató con 50  $\mu\text{M}$  y 250  $\mu\text{M}$ , para el medio definido MDFP se evaluó la concentración de 250  $\mu\text{M}$ . Las condiciones del cultivo al igual que la extracción del medio de cultivo y el método de extracción del medio de cultivo se describen en los apartados 4.12.3 y 4.12.4 de Materiales y Métodos. Los extractos obtenidos fueron analizados por un espectrómetro de masas acoplado a cromatografía de líquidos (LC-MS), las condiciones del análisis se describieron en la sección 4.13. Los perfiles cromatográficos generados por el equipo fueron visualizados y analizados por el programa bioinformático Mzmine2 (4.10.2.1), en el cual se pudo evidenciar la aparición de cambios del perfil de metabolitos con respecto a la muestra control por medio del uso del algoritmo de alineamiento RANSAC como se observa en la figura 5.1 (d) y apéndice B, y se aprecian en la visualización de los diferentes cromatogramas en las figuras 5.1, 5.2, 5.3.



## 5.1 Análisis del Cambio en el Perfil de Metabolitos Inducido por el Remodelador de la Cromatina 5-azacitidina (5-aza)



**Figura 5.2:** Señalización de variaciones en segmentos de los cromatogramas de LC-MS correspondientes al experimento con 5-aza. Medio MDFP aplicando 250  $\mu\text{M}$  de 5-aza, se muestra el patrón de referencia del extracto del medio sin 5-aza (en color verde) junto con tratamiento y duplicado en colores rojo y verde.



**Figura 5.3:** Señalización de variaciones en cromatogramas de LC-MS correspondientes al experimento con 5-aza en medio PDB, aplicando 50 y 250  $\mu\text{M}$  de 5-aza. El patrón de referencia (extracto del medio sin 5-aza) se muestra en color azul, y los extractos pertenecientes a los cultivos con tratamiento de 5-aza se muestran en color rojo y verde (duplicados).

### 5.2. Análisis del Cambio en el Perfil de Metabolitos Inducido por el Modificador de la Cromatina Tricostatina A (TSA)

#### 5.2.1. Aplicación de TSA a Medios de Cultivo Líquidos de *P. chrysogenum*: MDFP y PDB

En esta ocasión las concentraciones del remodelador TSA aplicadas fueron de 0.25  $\mu\text{M}$  para el medio MDFP, 0.25  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  para el medio complejo PDB. Al igual que en la sección 5.1.1 el medio de cultivo se extrajo, fue inyectado a un equipo de LC-MS (4.13), y los cromatogramas generados se visualizaron y analizaron con la ayuda de Mzmine2 (4.10.2.1). El uso de este programa también evaluó y señaló la aparición de variaciones en el perfil de metabolitos que se presentaron en las diferentes concentraciones de TSA, esto aplicando el alineamiento de RANSAC (figura 5.4 (d) y apéndice B) contra el control. Los diferentes cromatogramas y diferencias de picos se muestran en las figuras 5.5, 5.6.

### 5.3. Identificación de *cclA* *in silico*

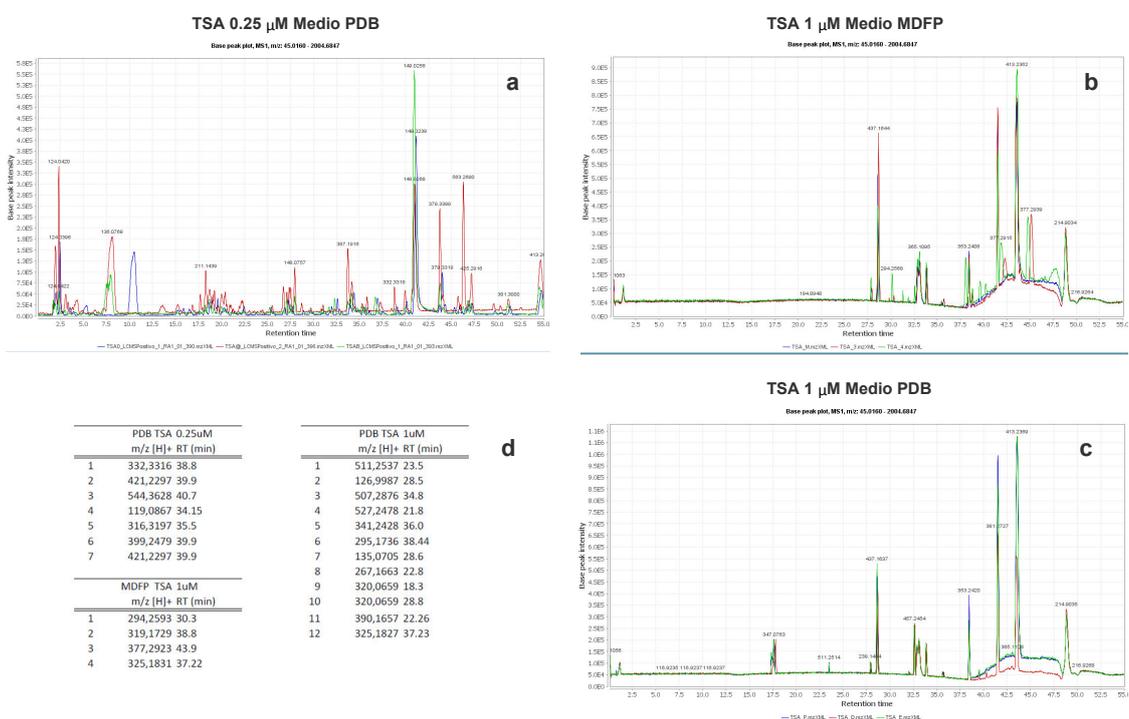
Por medio de la base de datos disponible en el portal del NCBI se realizó un Blast en donde fue identificado el gen Pc14g00650 en *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, hemos denominado *cclA*, al ser homólogo al gen del mismo nombre en *A. nidulans* (AN9399.2), donde se ha caracterizado su función, y con el cual presenta un 73 % de identidad en la secuencia de la proteína deducida, como se puede observar en el apéndice A, panel B.

### 5.4. Clonación del Gen *cclA* en pBluescript KS (+)

#### 5.4.1. Amplificación por PCR del Gen *cclA*

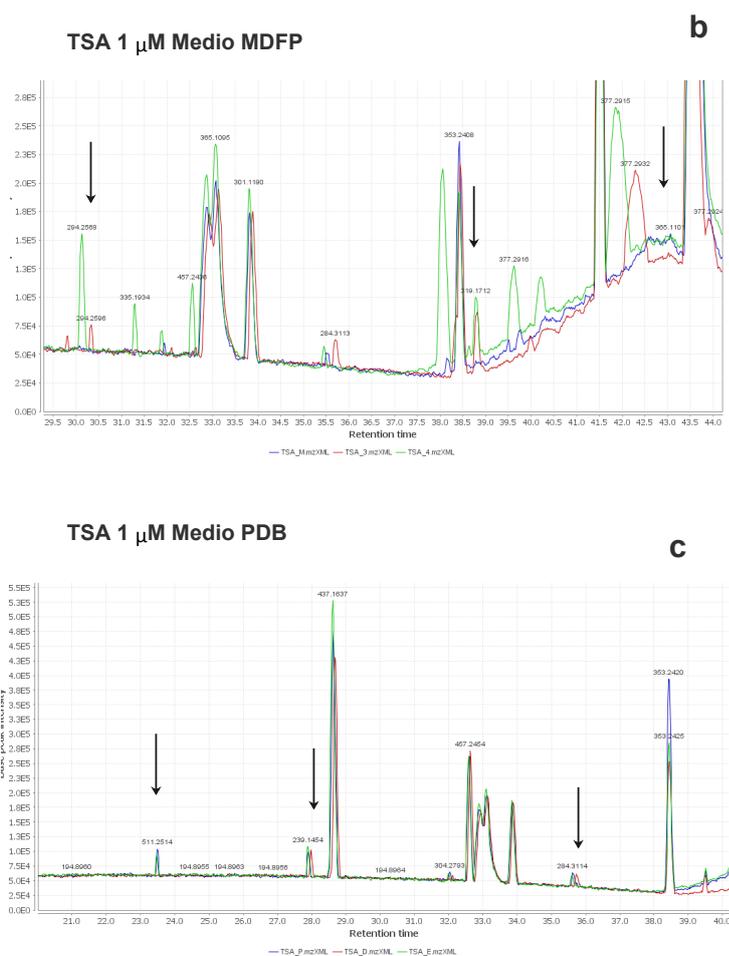
Luego de localizar el gen de *cclA* en el genoma de *P. chrysogenum* se procedió a amplificar el fragmento genómico por PCR, para esto fueron utilizados los oligonucleótidos *cclA*-F y *cclA*-R (ver tabla 4.1 del apartado 4.7) diseñados para amplificar un fragmento de 3645 pb. Se empleó ADN total de *P. chrysogenum* como molde y la enzima *PfuUltra II Fusion* (Agilent), una polimerasa de alta fidelidad, ideal para obtener productos de PCR que serán subsecuentemente clonados (Figura 5.7). Primero

## 5.4 Clonación del Gen *cclA* en pBluescript KS (+)

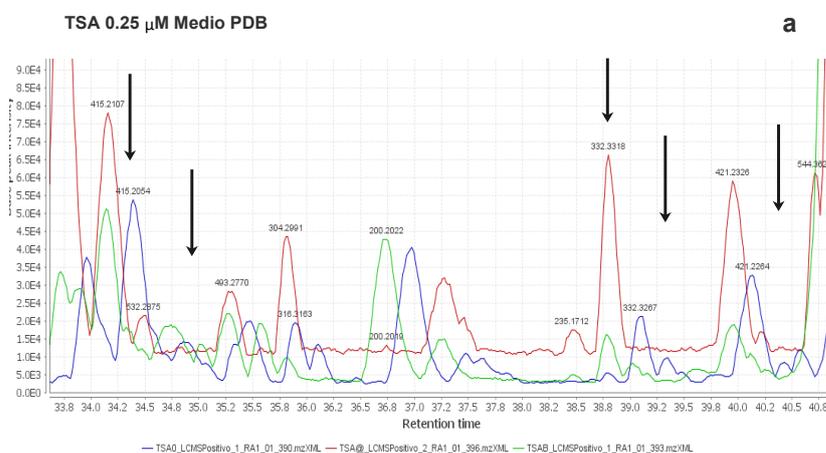


**Figura 5.4:** Cromatogramas de LC-MS correspondientes al experimento con TSA (**a** – **c**) El patrón de referencia (extracto del medio sin TSA) se muestra en color azul, y los perfiles correspondientes a los extractos de medio con TSA se muestran en color rojo y verde (duplicados). **d**) Resultado del análisis en MZmine2 para cada condición analizada en este estudio.

## 5. RESULTADOS



**Figura 5.5:** Señalización de variaciones en segmentos del cromatograma de LC-MS correspondiente al experimento con TSA. **a)** Medio MDFP aplicando 1  $\mu$ M TSA. **b)** Medio PDB aplicando 1  $\mu$ M TSA. El patrón de referencia (extracto del medio sin TSA) se muestra en color azul, y los perfiles correspondientes a los extractos de medio con TSA se muestran en color rojo y verde (duplicados).



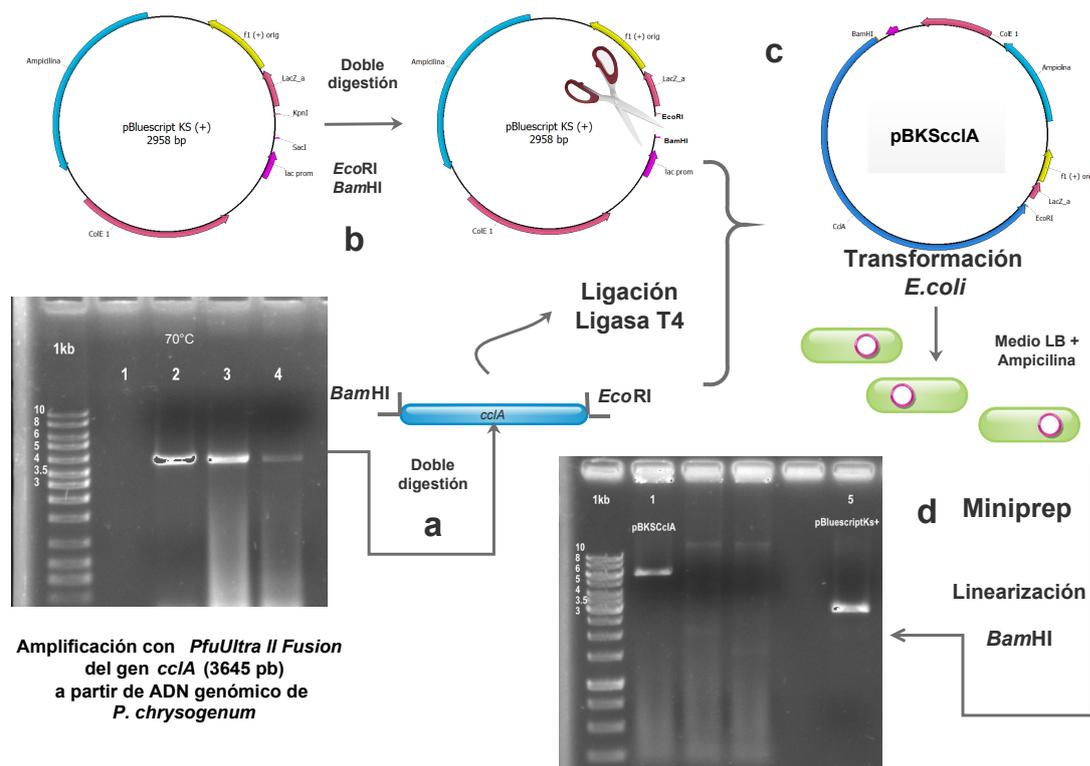
**Figura 5.6:** Señalización de variaciones en segmento del cromatograma de LC-MS correspondientes al experimento con medio PDB aplicando  $0.25 \mu\text{M}$  de TSA. El patrón de referencia (extracto del medio sin TSA) se muestra en color azul, y los perfiles correspondientes a los extractos de medio con TSA se muestran en color rojo y verde (duplicados).

se realizó un gradiente de temperatura de anillamiento de  $66$  a  $70^\circ\text{C}$ . Finalmente las condiciones de reacción y operación del termociclador se muestran en las tablas 4.2 y 4.4 sección 4.15.

#### 5.4.2. Construcción del plásmido pBKScclA

Cuando se amplificó el fragmento deseado este fue separado por electroforesis, cortado y purificado por columna (sección 4.14.9). Posteriormente fueron digeridos por separado el fragmento del gen *cclA* y el plásmido pBluescript KS (+) con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. Después se procedió a la ligación del fragmento *cclA* y pBluescript KS (+) con la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 descrito en la sección 4.14.6. Luego se procedió a transformar *E. coli* y se realizó extracciones de ADN a pequeña escala por Miniprep, estos dos últimos procedimientos se describen en los apartados 4.14.7 y 4.14.2 respectivamente. Al analizar el vector por corte con enzima de restricción *Bam*HI, se determinó la presencia del fragmento del gen *cclA* (figura 5.7) por la presencia de una banda de  $6603$  pb. Posteriormente se extrajo el plásmido denominado pBKScclA a gran escala por Megaprep (sección 4.14.3).

## 5. RESULTADOS



**Figura 5.7:** Construcción del vector pBKScclA. **a)** Gel de agarosa 1% con la amplificación por PCR del gen *cclA* (3645 pb), este fragmento se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI, que cortan en los extremos del mismo ya que se introdujeron sus sitios de corte en la secuencia de los primers utilizados para la amplificación por PCR. **b)** Ilustración del plásmido pBluescript KS (+) señalando donde se alojará el inserto y el corte con las endonucleasas de restricción. A continuación se señala la reacción de ligación entre *cclA* y el plásmido. **c)** Se muestra el mapa del vector pBKScclA. **d)** Extracción del plásmido por minipreparación y posterior análisis de la integración del gen *cclA* por corte con la endonucleasas de restricción *Bam*HI el cual se visualiza en el gel de agarosa 1% con su control.

## 5.5. Construcción del Vector pSiRNA-cclA

### 5.5.1. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *cclA* para silenciamiento por RNAi

Para esta segunda amplificación se emplearon los oligonucleótidos cclA-RNAi-F y cclA-RNAi-R (ver tabla 4.1 del apartado 4.7) diseñados para amplificar en esta ocasión un fragmento de 441 pb (figura 5.8). Para la reacción de PCR el ADN molde fue el vector pBKScclA y la enzima fue *PfuUltra II Fusion*. Las condiciones de reacción y operación del termociclador se muestran en las tablas 4.2 y 4.4 sección 4.15.

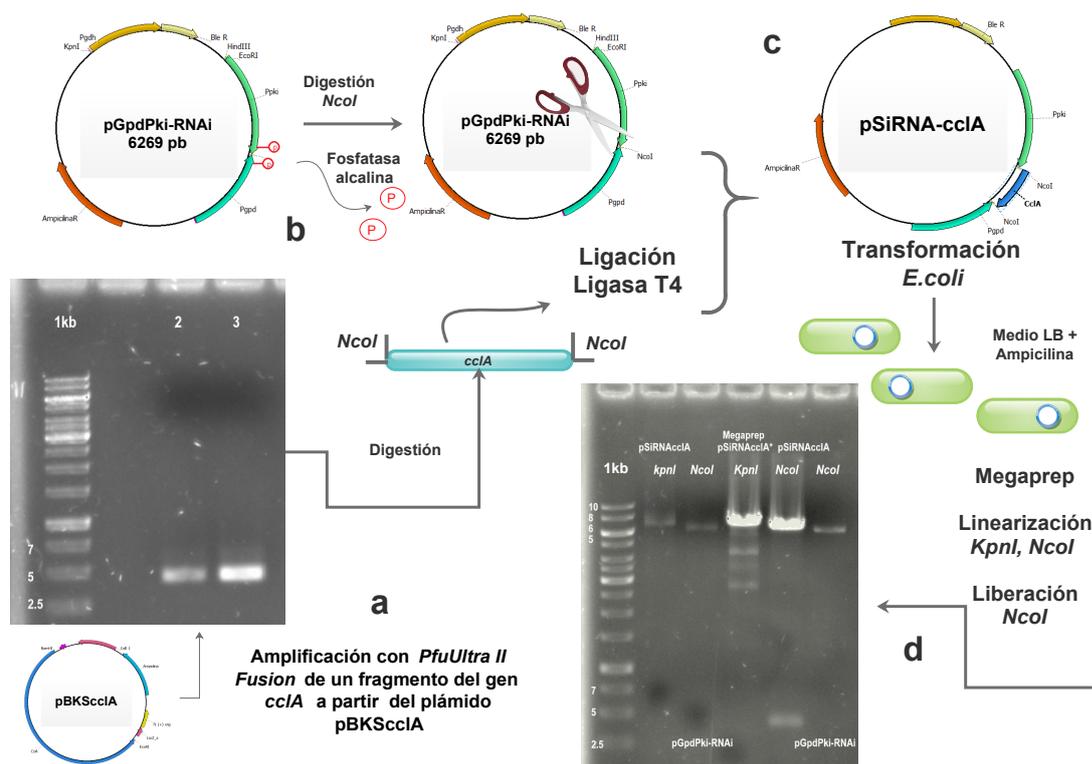
### 5.5.2. Clonación del fragmento para silenciamiento del gen *cclA* en el Vector pGpdPki-RNAi

El fragmento de *cclA* fue separado por electroforesis, cortado y purificado por columna (sección 4.14.9). A continuación fueron digeridos por separado el fragmento de *cclA* y el plásmido pGpdPki-RNAi con la enzima de restricción *NcoI*, luego fue desfosforilado el plásmido con fosfatasa alcalina (descrito en el apartado 4.14.5), posteriormente se llevó a cabo la reacción de ligación entre el vector y el inserto de 441 pb del gen *cclA* A continuación con la enzima ligasa del bacteriófago T4. A continuación se transformó *E. coli* (sección 4.14.7), el plásmido obtenido se nombró pSiRNA-cclA. Posteriormente se analizó el plásmido pSiRNA-CclA extraído por Miniprep y Megaprep con las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI* para asegurarnos que el fragmento se encontraba dentro del vector como lo muestra la figura 5.8, donde se aprecia la banda del vector pSiRNA-cclA linearizado con *KpnI* de 6600pb, comparado con el control de 6269 pb, y cuando el vector se digirió con la enzima *NcoI* se observa un fragmento liberado menor a 500 pb que corresponde al fragmento de 441 pb del gen de *cclA*. También se confirmó la presencia de parte del fragmento del gen *cclA* por secuenciación empleando el oligonucleótido cclA(pki)-R.

## 5.6. Transformación de *P. chrysogenum* NRRL 1951 con los Vectores pSiRNA-cclA y pGpdPki-RNAi

La transformación de *P. chrysogenum* NRRL 1951 se llevó según lo descrito en el apartado 4.16. El plásmido pGpdPki-RNAi fue empleado como control para introducir únicamente los componentes del vector. Para ambos plásmidos se utilizó fleomicina

## 5. RESULTADOS



**Figura 5.8:** Construcción del vector pSiRNA-cclA. **a)** Gel de agarosa 1% con la amplificación por PCR del fragmento del gen *cclA* (441pb) a partir de plásmido pBKS*cclA*, este fragmento se digirió con la endonucleasa de restricción *NcoI*, que corta en los extremos del mismo ya que se introdujo su sitio de corte en la secuencia de los primers utilizados para la amplificación por PCR de dicho fragmento. **b)** Ilustración del plásmido pGpdPki-RNAi señalando donde fue cortado por *NcoI* y desfosforilado. En seguida se realizó la reacción de ligación entre *cclA* y el plásmido. **c)** Se ilustra la construcción del vector pSiRNA-cclA que luego fue clonado en *E. coli*. **d)** Análisis de la integración de del fragmento de 441 pb por corte con las endonucleasas de restricción *KpnI* y *NcoI*, el cual se visualiza en el gel de agarosa 0.8% con sus controles.

como marcador de selección, a una concentración final de 4 a 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Luego de obtener colonias posiblemente transformantes se realizó una selección para obtener transformantes homocariontes la cual se detalla en el apartado 4.16.3. Se obtuvieron inicialmente 32 transformantes y antes de realizar un análisis por PCR se sembraron nuevamente en medio Czapek con fleomicina a una concentración final de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , de donde se recuperaron, extrayéndose a continuación ADN genómico (sección 4.14.1) de 26 transformantes.

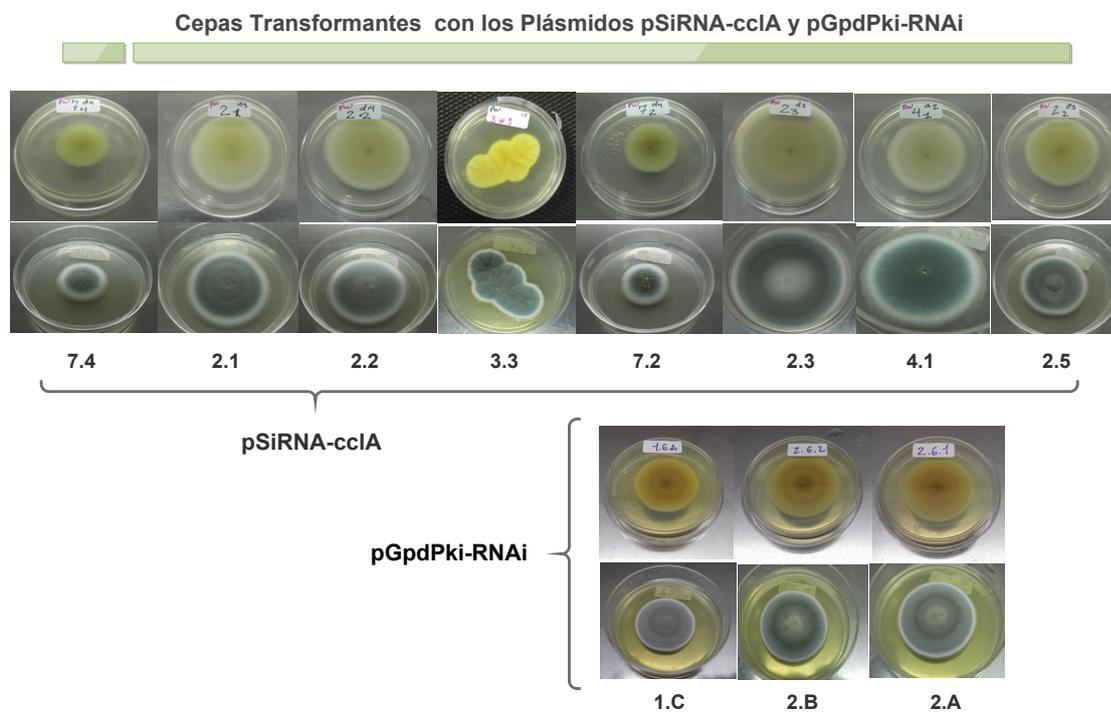
### 5.6.1. Análisis por PCR de Transformantes

Se llevó a cabo la comprobación por PCR, a partir ADN genómico, de la integración de los plásmidos en las cepas transformantes, para ello se emplearon dos pares de oligonucleótidos, el primero de ellos Ble-tr1-F y Tcyc-tr1-R (ver tabla 4.1 del apartado 4.7) diseñado para amplificar parte del *cassette* de resistencia a fleomicina y el terminator *Tcyc* que posee el plásmido, que comprende un total de 551 pb . El segundo par de oligonucleótidos pki(gdp)-F y gpd(pki)-R (ver tabla 4.1 del apartado 4.7 ) diseñado para amplificar aproximadamente 650 pb en el caso de que el inserto se encuentre entre presente los dos promotores *Ppki* y *Pgpd* que están en orientación invertida, de lo contrario, si no se encuentra presente el inserto, se amplifica un fragmento de 250 pb como se muestra en la Figura 5.10. Las condiciones de reacción y operación del termociclador se muestran en las tablas 4.3 y 4.5 de la sección 4.15 respectivamente. Finalmente se recuperaron 11 cepas transformantes (figura 5.9) de las cuales ocho contenían el vector pSiRNA-cclA, y tres cepas transformantes con el plásmido pGpdPki-RNAi.

## 5.7. Análisis del genoma de *P. chrysogenum* para buscar genes de metabolismo secundario con el *Software* antiSMASH

Para el uso de esta plataforma *Web* dedicada a la predicción de *clustres* de genes del metabolismo secundario, se emplearon las secuencias genómicas que se encuentran en las bases de datos de libre acceso, disponibles en la red, como lo es la NCBI o la ENA (*European Nucleotide Archive*) . Luego de ingresar los diferentes datos que requiere el programa bioinformático antiSMASH, los cuales fueron descritos en la sección 4.18.1, se llevó a cabo el análisis. Después de finalizado el análisis se procedió a la visualización de los resultados los cuales se muestran en la tabla 5.1 y apéndice C. Igualmente en

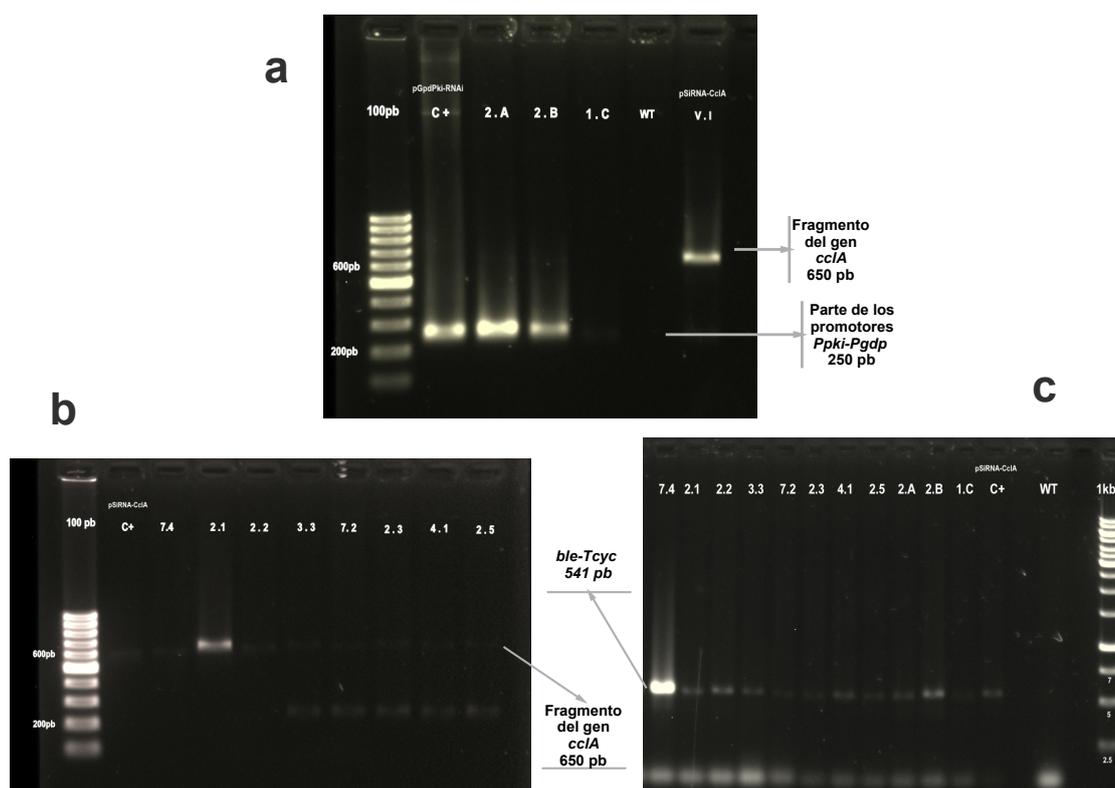
## 5. RESULTADOS



**Figura 5.9:** Cepas transformante con los vectores pSiRNA-cclA y pGpdPki-RNAi. Se muestra las cepas transformantes en su último pase de selección en medio PW.

la tabla 5.1 se presenta la predicción hecha para *P. chrysogenum* en 2008 por Van den Berg (98) con SMURF, otro programa disponible para la búsqueda de *clusters* del metabolismo secundario.

5.7 Análisis del genoma de *P. chrysogenum* para buscar genes de metabolismo secundario con el *Software* antiSMASH



**Figura 5.10:** Análisis por PCR de transformantes. (a – b) Geles de agarosa al 0.8% con los productos de PCR del fragmento del gen *cclA* (650 pb) y/o promotores *Ppki* y *Pgpd* (250 pb). En el gel a) en el segundo carril de izq. a der. esta el control positivo (solo vector pGpPki-RNAi), del tercer al quinto carril están las amplificaciones de las transformantes control (2.A, 2.B y 1.C) que integraron el plásmido pGpPki-RNAi. En el sexto carril está el control negativo de la cepa parental y en el último carril está otro control con el vector pSiRNA-cclA. En el gel b) están las amplificaciones de la integración del vector pSiRNA-cclA en las transformantes (7.4 - 2.5), y en el segundo carril está el control positivo (vector pSiRNA-cclA). c) Gel de agarosa al 1%, con los productos de PCR a amplificación de parte del cassette de resistencia a fleomicina y el terminador *Tcyc* (541 pb), los once carriles de izq. a dere. corresponden a las cepas transformantes que integraron los plásmidos pSiRNA-cclA (7.4 - 4.1) y pGpPki-RNAi (2.A - 1.C). El control positivo (solo vector pSiRNA-cclA) en el carril doce, y el control negativo de la cepa parental en el carril catorce.

## 5. RESULTADOS

Organismo	<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	Número y tipo de <i>clusters</i> identificados por <i>software</i> bioinformáticos	
		SMURF	antiSMASH <sup>a</sup>
Número de acceso al genoma EMBL	AM920421; AM920427; AM920428; AM920429; AM920431; AM920433; AM920435; AM920436; AM920437	33	53
		PKS 20 NRPS 10 PKS-NRPS 2 Dimetilalil triptófano sintasa 1	PKS 17 NRPS 6 Terpenos (terp) 7 PKS-NRPS 3 Sideróforo 1 Ácidos grasos (Ag) 3 NRPS-Indol 1 terp-NRPS-Ag 1 Otros 15
Tamaño del genoma (Mb)	32.2	<i>a.</i> Número de <i>clusters</i> homólogos a <i>clusters</i> con función conocida (%) (17)	

**Tabla 5.1:** Resumen de *clusters* de MS identificados con antiSMASH en el genoma de *Penicillium chrysogenum*. Se exponen los números de acceso del genoma del hongo en formato EMBL, también se presenta el número y tipos de *clusters* encontrados por el *software*. En contraste se muestra los *clusters* reportados previamente para este hongo pero bajo el análisis de SMURF (98).

### 6.1. Análisis del Cambio en el Perfil de Metabolitos Inducido por el Remodelador de la Cromatina 5-azacitidina

En este ensayo se empleó el compuesto 5-aza un inhibidor de HMT y DNMT. Las concentraciones manejadas para *P. chrysogenum* fueron de 50 y 250  $\mu\text{M}$ , dado que se han reportado en hongos filamentosos como *P. citreonigrum* y *A. sydowii* concentraciones similares, y que provocaron la producción de nuevos compuestos bioactivos (28, 100).

El cultivo tuvo una duración de 15 días a partir de 5-aza, en medios de cultivos líquidos: definido (MDFP) y medio complejo (PDB). Los extractos resultantes se analizaron por la técnica de LC-MS. Los archivos de los cromatogramas generados del análisis por LC-MS fueron analizados con el programa MZmine2 (figura 5.1). Los cromatogramas mostraron sobre el eje Y los picos de las diferentes relaciones entre la masa/carga ( $m/z$ ) detectadas, y sobre el eje X el tiempo de retención (RT) en que los compuestos fueron detectados. En una misma ventana de visualización se mostraron los cromatogramas del patrón presentado por el control (medio sin 5-aza) y del tratamiento (medio con la concentración correspondiente de 5-aza) con su duplicado.

De primera instancia, se observó que los cromatogramas para cada concentración estudiada junto con su control presentaron un perfil similar, no obstante, los extractos de los medios en los que fue agregado 5-aza, presentaron adicionalmente variaciones de algunas  $m/z$  con respecto al patrón cromatográfico del control, señaladas en las figuras 5.2, 5.3. Para corroborar dichos cambios fue necesario emplear MZmine2.

## 6. DISCUSIÓN

---

Este software proporciona una aplicación que permite alinear los picos detectados en cada muestra, y de esta manera se aprovechó esta función con cada uno de los tratamientos realizados en el presente trabajo. Se evidenció entonces la aparición de cambios reproducibles de  $m/z$  en un RT específico; tanto para el tratamiento como su duplicado, los cuales no se presentaron en el comportamiento de su respectivo control (figuras 5.1(d) y Anexo B).

Con este análisis se pudo evidenciar también la aparición de varios picos de  $m/z$  diferentes, los cuales no se presentaron en el control, demostrando que posiblemente el compuesto 5-aza está influyendo en el cambio del perfil de MS producidos por *P. chrysogenum*. De igual manera, el número de picos detectados fue diferente dependiendo de la concentración aplicada; ya que para la concentración de 50  $\mu\text{M}$  en medio PDB solo se detectaron 5  $m/z$  diferentes; mientras que con la concentración de 250  $\mu\text{M}$ , se detectaron 13  $m/z$  diferentes en el medio MDFP y 21  $m/z$  diferentes en el medio PDB.

También se pudo apreciar que en las dos concentraciones de 5-aza aplicadas en el medio PDB, coincide la detección de 2 picos con la misma  $m/z$  y RT, siendo éste un resultado llamativo en el que se debe profundizar, ya que estos picos solo se presentaron en el cultivo con este medio. Se podría señalar que el medio PDB, es un medio satisfactorio para implementarlo en este tipo de ensayos, como ha ocurrido anteriormente en ensayos para hongos con remodeladores de la cromatina (28, 108).

El programa Mzmine2 también brinda la posibilidad de buscar en las bases de datos existentes en la *Web*, la identificación de picos, en base a compuestos previamente reportados, que presenten una masa altamente cercana; o también se puede emplear la aplicación para generar una posible fórmula.

## 6.2. Análisis del Cambio en el Perfil de Metabolitos Inducido por el Remodelador de la Cromatina Tricostatina A

La utilización de TSA, un compuesto inhibidor de las HDAC, se utilizó en este trabajo en concentraciones mucho menores que las empleadas para 5-aza, debido a que se ha reportado que concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  inducen cambios en el metabolismo secundario de *A. alternata* y *P. expamsum* (88).

En este estudio se aplicaron concentraciones de 0.25 y 1  $\mu\text{M}$ , en medios líquidos PDB y MDFFP, en cultivos que se mantuvieron durante 15 días después de ser agregado el compuesto inhibidor. A continuación se siguió la misma metodología que se empleó para los extractos a partir de medio con 5-aza, y de la misma forma se realizó la técnica analítica y los cromatogramas, analizados por MZmine2 (figura 5.4).

Se observó en los cromatogramas para cada concentración, que presentaron un perfil de elución similar, pero el comportamiento de los extractos a partir de medios en que fue adicionado TSA mostró variaciones de m/z con respecto al patrón cromatográfico del control, señaladas en las figuras 5.5, 5.6. Dichos picos adicionales fueron analizados con MZmine2. Específicamente para los ensayos con la concentración 1 $\mu\text{M}$ , se consideró también el análisis del metanol, disolvente en que se fueron resuspendidos los extractos.

Luego de aplicar en el programa el alineamiento de los picos detectados para cada uno de los tratamientos realizados en este estudio (apéndice B), fue posible evidenciar la aparición de variaciones reproducibles de m/z en un RT específico entre el tratamiento (y su duplicado) y el control (figuras 5.4 (d)).

Por lo que tomando en consideración este resultado, la aparición de varios picos de m/z adicionales y que no se presentan en el control, ponen de manifiesto que la incorporación del compuesto TSA al medio de cultivo, probablemente están influyendo en el cambio del perfil de metabolitos secundarios producidos por *P. chrysogenum*; de igual forma como se presentó en el análisis con el compuesto remodelador 5-aza.

En el caso de TSA, el número de picos detectados en el alineamiento fue diferente,

dependiendo de la concentración aplicada, ya que para la concentración de  $0.25 \mu\text{M}$  en medio PDB, se detectaron 6 m/z diferentes y en el medio MDFP con TSA a  $1\mu\text{M}$  también 6 m/z fueron detectadas. Con la misma concentración de TSA pero en medio PDB, se presentaron 11 m/z diferentes, de las cuales también un pico coincide su aparición en el medio MDFP, este es un dato interesante en el que será necesario profundizar.

Con respecto a los medios empleados PDB ofreció una mayor capacidad de producción de MS así como un mejor comportamiento del inhibidor TSA en cuanto a la inducción de cambios de m/z en diferentes picos, algo que también se evidenció al usar 5-aza.

Con estos ensayos se consiguió mostrar que el compuesto remodelador TSA presentó cambios adicionales sobre el comportamiento del perfil cromatográfico, siendo un compuesto prometedor para la estimulación del metabolismo secundario. El uso de TSA en *A. clavatus* permitió un aumento en la producción de los MS patulin y cytochalasin E (112).

### 6.3. Transformación de *P. chrysogenum* NRRL 1951 con los Vectores pSiRNA-cclA y pGpdPki-RNAi

Las cepas transformantes que crecieron en el medio de regeneración selectiva con el antibiótico fleomicina se sometieron a un proceso laborioso de selección para obtener colonias homocariontes. Estas colonias mostraron un fenotipo similar al de la cepa silvestre como se aprecian en la figura 5.9: crecimiento radial, textura algodonosa, conidios abundantes color oliva, con una corona radial blanca; alguna de ellas exudaron un pigmento amarillo. Las cepas transformantes con el plásmido pGpdPki-RNAi, igualmente presentaron un fenotipo sin cambios.

Posteriormente se procedió con el análisis por PCR para corroborar la integración ectópica (36) de los plásmidos en las transformantes. Para esto se amplificó parte del *cassette* de resistencia a fleomicina y el terminador Tcyc (figura 5.10 (c)) visualizándose una banda correspondiente a 541 pb.

Seguidamente, se realizó una segunda PCR, esta vez los oligonucleótidos fueron di-

señados para amplificar la presencia del fragmento a silenciar, en este caso, parte del gen *cclA* insertado entre los dos promotores enfrentados Ppki y Pgpd. En la figura 5.10, El gel a) presenta la amplificación de una banda de 250 pb que corresponde con las colonias transformantes, que solamente integraron el plásmido de pGpdPki-RNAi, lo cual correspondería a la cepa control. En el gel b) se ven las amplificaciones de una sola banda de 650 pb, correspondiente con la presencia del fragmento de 441 pb del gen *cclA* para las cepas transformantes con el vector pSiRNA-cclA (cepas 7.4, 2.1, 2.2). Las demás cepas del gel aparecen con una banda adicional correspondiente a 250 pb, en este caso podemos mencionar que probablemente las transformantes pueden poseer los dos vectores. Esto evidencia una contaminación que pudo ocurrir cuando se realizó el miniprep, y se picó más de una colonia de *E. coli*, se combinó una colonia con el plásmido pGpdPki-RNAi y otra colonia con el vector pSiRNA-cclA que crecieron juntas; o hubo contaminación durante la extracción del ADN genómico, mezclándose accidentalmente el ADN de transformantes con el vector pSiRNA-cclA y al ADN de transformantes con el plásmido control.

Por otro lado queda pendiente el poder evaluar el efecto del plásmido pSiRNA-cclA en *P. chrysogenum*, como un mecanismo para silenciar el gen *cclA*, un componente del complejo COMPASS, que a su vez está involucrado en la regulación epigenética de MS. La delección del gen *cclA*, provocó un aumento de la producción de MS en *A. nidulans*, *A. fumigatus* y *Aspergillus oryzae* (14, 41, 74, 87).

El mecanismo de silenciamiento (figura 4.2) hace posible el *knockdown* de genes, y se ha convertido en un recurso útil y alternativo para estudiar la función de los genes (57). El plásmido empleado en este trabajo contiene un *cassette* de expresión para la síntesis de dsRNA, y este sistema ha sido evaluado en hongos filamentosos como *P. chrysogenum*, *Acremonium chrysogenum* y *Trichoderma longibrachiatum* (33, 96).

De este modo, en lo posterior, se podrá evaluar este mecanismo y comparar la eficiencia con otras estrategias de la minería genómica, encaminada hacia la búsqueda de la expresión de *clusters* de genes crípticos en *P. chrysogenum*, y en diversos hongos filamentosos.

### 6.4. Análisis del genoma de *P. chrysogenum* para buscar genes de metabolismo secundario con el *Software* antiSMASH

En este trabajo se utilizó antiSMASH, un *software* dotado de múltiples atributos que se encuentra disponible en una plataforma *web*, dedicada a la predicción de *clusters* biosintéticos del metabolismo secundario. Investigaciones anteriores se había reportado la utilización de SMURF (también un programa para la predicción de *clusters* de MS) que analizó las secuencias del genoma de *P. chrysogenum* cuando este fue recién secuenciado en 2008 (98)

Las secuencias de *P. chrysogenum* fueron nuevamente analizadas, esta vez por antiSMASH y el resultado del análisis realizado en este trabajo se puede ver en la figura 5.1, en donde se muestran los resultados respectivos. También se evidenció, que al comparar estas predicciones con las 33 realizadas previamente con SMURF, se observaron que los tipos de *clusters* del metabolismo secundario, identificados con antiSMASH se ampliaron a 53 predicciones, las que fueron : 17 PKS, 6 NRPS y 3 híbridos de PKS-NRPS, y adicionalmente se identificaron *clusters* para la biosíntesis de 7 terpenos (terp), 3 ácidos grasos (AG), un sideróforo y un par de híbridos uno de NRPS-indol y otro para terp-NRPS-AG, además de 15 *clusters* que pueden producir algún otro tipo de metabolito secundario.

En este análisis se obtuvieron nueve *clusters*, que son homólogos a *clusters* con una función conocida. En este caso la homología se presentó principalmente, con otras especies de *Penicillium* (*P. digitatum*, *P. expansum*, *P. italicum* y *P. roqueforti*), y también se presentó alta homología con un *cluster* del hongo *Stachybotrys chartarum*. A su vez estos *clusters* de metabolitos secundarios homólogos producen compuestos como: patulin, meleagrín, trans-resorcylide, aflatrem, citocalasina E, yanuton y PR toxina. Se puede agregar que el programa antiSMASH nos mostró, que el número de *clusters* identificados, aumentó significativamente (53); al igual que se diversificó la identificación del tipo de *clusters* de genes putativos del metabolismo secundario predichos.

Estos datos nos muestran el número de MS que puede potencialmente producir *P. chrysogenum* es superior al descrito anteriormente en *P. chrysogenum*. En la actualidad ya son numerosas las plataformas y bases de datos biológicas disponibles para la predicción de metabolitos secundarios (102), lo que aumenta el número de herramientas disponibles para sacar el máximo provecho de la información genómica de los hongos, es decir, para la puesta en práctica de estrategias de minería genómica.



## Conclusiones y Perspectivas

---

### 7.1. Conclusiones

De acuerdo al estudio realizado, podemos establecer la siguientes conclusiones:

- ✧ Las diferentes concentraciones adicionadas de los compuestos 5-aza y TSA provocaron cambios en el perfil cromatográfico de los metabolitos secundarios.
- ✧ La concentración de 250  $\mu\text{M}$  del inhibidor 5-aza favoreció la aparición de más variaciones que las detectadas en el tratamiento con 50  $\mu\text{M}$ .
- ✧ La concentración de 1  $\mu\text{M}$  de TSA ocasionó la aparición de más picos en el cromatograma, especialmente en el medio PDB.
- ✧ El medio de cultivo PDB es más favorable para provocar un aumento en la producción de nuevos posibles MS que el medio MDFP cuando se añaden remodeladores epigenéticos.
- ✧ Los datos obtenidos sugieren que las adiciones de los compuestos 5-aza y TSA probablemente estimulan la activación de *clusters* crípticos de metabolitos secundarios en *P. chrysogenum* NRRL 1951.
- ✧ Se obtuvieron cepas transformantes con el plásmido pSiRNA-cclA para estudiar posteriormente el silenciamiento del gen *cclA* de *P. chrysogenum*.
- ✧ Se identificaron 53 posibles *clusters* del metabolismo secundario en *P. chrysogenum* utilizando la plataforma antiSMASH, lo que incrementa en un número de 33 los previamente detectados mediante el *software* SMURF.

### 7.2. Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente estudio ofrecen la posibilidad de avanzar en los siguientes aspectos:

- ✧ Analizar el silenciamiento del gen *cclA* en las cepas transformadas con el vector pSiRNA-*cclA*.
- ✧ Realizar cultivos en medio PDB de los transformantes con mayor grado de silenciamiento del gen *cclA* y someter los extractos a los análisis de LC-MS puestos a punto en este trabajo.
- ✧ Purificar los compuestos nuevos obtenidos tras la adición de 5-aza y TSA e identificarlos y/o determinar su estructura química.
- ✧ Llevar a cabo ensayos de actividad biológica con los compuestos purificados y con extractos resultantes de cultivos realizados con remodeladores de la cromatina.
- ✧ Aplicar estrategias de minería genómica para la producción e identificación de los compuestos producidos por los nuevos *clusters* del MS identificados mediante antiSMASH en el genoma de *P. chrysogenum*.

## Bibliografía

---

- [1] ALI, H., RIES, M. I., NIJLAND, J. G., LANKHORST, P. P., HANKEMEIER, T., BOVENBERG, R. A., VREEKEN, R. J., AND DRIESSEN, A. J. A branched biosynthetic pathway is involved in production of roquefortine and related compounds in *Penicillium chrysogenum*. *PLoS one* 8, 6 (2013), e65328. [1](#)
- [2] ANDERSEN, M. R., NIELSEN, J. B., KLITGAARD, A., PETERSEN, L. M., ZACHARIASEN, M., HANSEN, T. J., BLICHER, L. H., GOTFREDSEN, C. H., LARSEN, T. O., NIELSEN, K. F., AND *et al.* Accurate prediction of secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 1 (2013), E99–E107. [14](#)
- [3] ANNÉ, J. Somatic hybridization between *Penicillium* species after induced fusion of their protoplasts. *Agricultura (Belgium)* (1977). [32](#)
- [4] ASAI, T., MORITA, S., TANIGUCHI, T., MONDE, K., AND OSHIMA, Y. Epigenetic stimulation of polyketide production in *Chaetomium cancroideum* by an nad<sup>+</sup>-dependent HDAC inhibitor. *Organic & biomolecular chemistry* 14, 2 (2016), 646–651. [16](#)
- [5] BACHMANN, B. O., AND RAVEL, J. Methods for in silico prediction of microbial polyketide and nonribosomal peptide biosynthetic pathways from dna sequence data. *Methods in enzymology* 458 (2009), 181–217. [14](#)
- [6] BACKUS, M., AND STAUFFER, J. The production and selection of a family of strains in *Penicillium chrysogenum*. *Mycologia* 47, 4 (1955), 429–463. [1](#)
- [7] BARTON, L., AND PRADE, R. Inducible rna interference of brla $\beta$  in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic cell* 7, 11 (2008), 2004–2007. [18](#)
- [8] BAYRAM, Ö., KRAPPMANN, S., NI, M., BOK, J. W., HELMSTAEDT, K., VALERIUS, O., BRAUS-STROMEYER, S., KWON, N.-J., KELLER, N. P., YU, J.-H., AND *et al.* VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 5882 (2008), 1504–1506. [10](#)
- [9] BEAU, J., MAHID, N., BURDA, W. N., HARRINGTON, L., SHAW, L. N., MUTKA, T., KYLE, D. E., BARISIC, B., VAN OLPHEN, A., AND BAKER, B. J.

- Epigenetic tailoring for the production of anti-infective cytosporones from the marine fungus *Leucostoma persoonii*. *Marine drugs* 10, 4 (2012), 762–774. [16](#)
- [10] BENNETT, J. Differentiation and secondary metabolism in mycelial fungi. *Secondary metabolism and differentiation in fungi*. Marcel Dekker, New York, NY (1983), 1–32. [4](#)
- [11] BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics* 58, 1 (2005), 1–26. [19](#)
- [12] BERGMANN, S., SCHÜMANN, J., SCHERLACH, K., LANGE, C., BRAKHAGE, A. A., AND HERTWECK, C. Genomics-driven discovery of pks-nrps hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nature chemical biology* 3, 4 (2007), 213–217. [15](#)
- [13] BÖHM, J., HOFF, B., O’GORMAN, C. M., WOLFERS, S., KLIX, V., BINGER, D., ZADRA, I., KÜRNSTEINER, H., PÖGGELER, S., DYER, P. S., AND *et al.* Sexual reproduction and mating-type-mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 4 (2013), 1476–1481. [7](#)
- [14] BOK, J. W., CHIANG, Y.-M., SZEWCZYK, E., REYES-DOMINGUEZ, Y., DAVIDSON, A. D., SANCHEZ, J. F., LO, H.-C., WATANABE, K., STRAUSS, J., OAKLEY, B. R., AND *et al.* Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nature chemical biology* 5, 7 (2009), 462–464. [10](#), [15](#), [65](#)
- [15] BOK, J. W., HOFFMEISTER, D., MAGGIO-HALL, L. A., MURILLO, R., GLASNER, J. D., AND KELLER, N. P. Genomic mining for *Aspergillus natural* products. *Chemistry & biology* 13, 1 (2006), 31–37. [15](#)
- [16] BOK, J. W., AND KELLER, N. P. *LaeA*, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp.* *Eukaryotic cell* 3, 2 (2004), 527–535. [10](#)
- [17] BOK, J. W., NOORDERMEER, D., KALE, S. P., AND KELLER, N. P. Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* 61, 6 (2006), 1636–1645. [10](#)
- [18] BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology* 11, 1 (2013), 21–32. [xxi](#), [6](#), [9](#)
- [19] BRAKHAGE, A. A., AND SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites—strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology* 48, 1 (2011), 15–22. [4](#), [6](#)
- [20] BRAKHAGE, A. A., SPRÖTE, P., AL-ABDALLAH, Q., GEHRKE, A., PLATTNER, H., AND TUENCHER, A. Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. In *Molecular Biotechnology of Fungal beta-Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases*. Springer, 2004, pp. 45–90. [4](#), [7](#)

- 
- [21] BRAKHAGE, A. A., THÖN, M., SPRÖTE, P., SCHARF, D. H., AL-ABDALLAH, Q., WOLKE, S. M., AND HORTSCHANSKY, P. Aspects on evolution of fungal  $\beta$ -lactam biosynthesis gene clusters and recruitment of trans-acting factors. *Phytochemistry* 70, 15 (2009), 1801–1811. [4](#), [7](#)
- [22] BROWN, D., YU, J., KELKAR, H., FERNANDES, M., NESBITT, T., KELLER, N., ADAMS, T., AND LEONARD, T. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 4 (1996), 1418–1422. [4](#)
- [23] CANTORAL, J., DIEZ, B., BARREDO, J., ALVAREZ, E., AND MARTÍN, J. High-frequency transformation of *Penicillium Chrysogenum*. *Nature Biotechnology* 5, 5 (1987), 494–497. [41](#)
- [24] CASQUEIRO, J., GUTIÉRREZ, S., BAÑUELOS, O., HIJARRUBIA, M. J., AND MARTÍN, J. F. Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction. *Journal of bacteriology* 181, 4 (1999), 1181–1188. [30](#)
- [25] CHANG, S.-S., ZHANG, Z., AND LIU, Y. Rna interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annual review of microbiology* 66 (2012), 305–323. [44](#)
- [26] CHEN, H.-J., AWAKAWA, T., SUN, J.-Y., WAKIMOTO, T., AND ABE, I. Epigenetic modifier-induced biosynthesis of novel fusaric acid derivatives in endophytic fungi from *Datura stramonium* L. *Natural products and bioprospecting* 3, 1 (2013), 20–23. [16](#)
- [27] CHRISTOFFERSEN, R. E. Antibiotics—an investment worth making? *Nature biotechnology* 24, 12 (2006), 1512–1514. [4](#)
- [28] CHUNG, Y.-M., WEI, C.-K., CHUANG, D.-W., EL-SHAZLY, M., HSIEH, C.-T., ASAI, T., OSHIMA, Y., HSIEH, T.-J., HWANG, T.-L., WU, Y.-C., AND *et al.* An epigenetic modifier enhances the production of anti-diabetic and anti-inflammatory sesquiterpenoids from *Aspergillus sydowii*. *Bioorganic & medicinal chemistry* 21, 13 (2013), 3866–3872. [16](#), [61](#), [62](#)
- [29] CIMERMANCIC, P., MEDEMA, M. H., CLAESEN, J., KURITA, K., BROWN, L. C. W., MAVROMMATIS, K., PATI, A., GODFREY, P. A., KOEHRSEN, M., CLARDY, J., AND *et al.* Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters. *Cell* 158, 2 (2014), 412–421. [14](#)
- [30] DANG, Y., YANG, Q., XUE, Z., AND LIU, Y. Rna interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryotic cell* 10, 9 (2011), 1148–1155. [44](#)
- [31] DEMAIN, A. L., AND FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. In *Fiechter, A., In History of Modern Biotechnology I*. Springer, 2000, pp. 1–39. [3](#)
-

- [32] DÍEZ, B., GUTIERREZ, S., BARREDO, J., VAN SOLINGEN, P., VAN DER VOORT, L., AND MARTIN, J. The cluster of penicillin biosynthetic genes. identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. *Journal of Biological Chemistry* 265, 27 (1990), 16358–16365. [4](#)
- [33] FELTRER, R., ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M. L., BARREIRO, C., GODIO, R. P., AND COQUE, J.-J. R. Characterization of a novel 2, 4, 6-trichlorophenol-inducible gene encoding chlorophenol o-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* responsible for the formation of chloroanisoles and detoxification of chlorophenols. *Fungal Genetics and Biology* 47, 5 (2010), 458–467. [65](#)
- [34] FIERRO, F., BARREDO, J. L., DIEZ, B., GUTIERREZ, S., FERNANDEZ, F. J., AND MARTIN, J. F. The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 13 (1995), 6200–6204. [4](#)
- [35] FIERRO, F., GARCÍA-ESTRADA, C., CASTILLO, N. I., RODRÍGUEZ, R., VELASCO-CONDE, T., AND MARTÍN, J.-F. Transcriptional and bioinformatic analysis of the 56.8 kb dna region amplified in tandem repeats containing the penicillin gene cluster in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal genetics and Biology* 43, 9 (2006), 618–629. [7](#)
- [36] FINCHAM, J. Transformation in fungi. *Microbiological reviews* 53, 1 (1989), 148–170. [64](#)
- [37] FISCH, K., GILLASPY, A., GIPSON, M., HENRIKSON, J., HOOVER, A., JACKSON, L., NAJAR, F., WÄGELE, H., AND CICHEWICZ, R. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 36, 9 (2009), 1199–1213. [12](#), [13](#)
- [38] GACEK, A., AND STRAUSS, J. The chromatin code of fungal secondary metabolite gene clusters. *Applied microbiology and biotechnology* 95, 6 (2012), 1389–1404. [8](#)
- [39] GARCÍA-ESTRADA, C., MARTÍN, J.-F., ET AL. Fungal secondary metabolites in the “omics” era. In *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Volume 2*. Springer, 2015, pp. 1–12. [XXI](#)
- [40] GARCÍA-RICO, R. O., MARTÍN, J. F., AND FIERRO, F. The *pga1* gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes a heterotrimeric g protein alpha subunit that controls growth and development. *Research in microbiology* 158, 5 (2007), 437–446. [26](#)
- [41] GILES, S. S., SOUKUP, A. A., LAUER, C., SHAABAN, M., LIN, A., OAKLEY, B. R., WANG, C. C., AND KELLER, N. P. Cryptic *Aspergillus nidulans* antimicrobials. *Applied and environmental microbiology* 77, 11 (2011), 3669–3675. [65](#)

- 
- [42] GLOVER, A., AND LEYLAND-JONES, B. Biochemistry of azacitidine: a review. *Cancer treatment reports* 71, 10 (1987), 959–964. 27
- [43] HARTING, R., BAYRAM, Ö., LAUBINGER, K., VALERIUS, O., AND BRAUS, G. H. Interplay of the fungal sumoylation network for control of multicellular development. *Molecular microbiology* 90, 5 (2013), 1125–1145. 11
- [44] HENGGEN, P. N. Preparing ultra-competent *Escherichia coli*. *Trends in Biochemical sciences* 21, 2 (1996), 75–76. 37
- [45] HENRIKSON, J. C., HOOVER, A. R., JOYNER, P. M., AND CICHEWICZ, R. H. A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. *Organic & biomolecular chemistry* 7, 3 (2009), 435–438. 15
- [46] HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. *Nature chemical biology* 5, 7 (2009), 450–452. 5
- [47] HOFFMEISTER, D., AND KELLER, N. P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural product reports* 24, 2 (2007), 393–416. 4
- [48] HONDA, S., LEWIS, Z. A., SHIMADA, K., FISCHLE, W., SACK, R., AND SELKER, E. U. Heterochromatin protein 1 forms distinct complexes to direct histone deacetylation and dna methylation. *Nature structural & molecular biology* 19, 5 (2012), 471–477. 9
- [49] HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J. C., AND SAMSON, R. A. Fleming’s penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA fungus* 2, 1 (2011), 87–95. 7
- [50] INGLIS, D. O., BINKLEY, J., SKRZYPEK, M. S., ARNAUD, M. B., CERQUEIRA, G. C., SHAH, P., WYMORE, F., WORTMAN, J. R., AND SHERLOCK, G. Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC microbiology* 13, 1 (2013), 91. 13
- [51] INOUE, H., NOJIMA, H., AND OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 1 (1990), 23–28. 37
- [52] JANUS, D., HOFF, B., AND KÜCK, U. Evidence for dicer-dependent rna interference in the industrial penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology* 155, 12 (2009), 3946–3956. 18
- [53] KELLER, N. P., AND HOHN, T. M. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* 21, 1 (1997), 17–29. 4
-

- [54] KELLER, N. P., TURNER, G., AND BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3, 12 (2005), 937–947. [3](#), [4](#)
- [55] KHALDI, N., SEIFUDDIN, F. T., TURNER, G., HAFT, D., NIERMAN, W. C., WOLFE, K. H., AND FEDOROVA, N. D. Smurf: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology* 47, 9 (2010), 736–741. [14](#)
- [56] KOSALKOVÁ, K., GARCÍA-ESTRADA, C., ULLÁN, R. V., GODIO, R. P., FELTRER, R., TEIJEIRA, F., MAURIZ, E., AND MARTÍN, J. F. The global regulator *LaeA* controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine c synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie* 91, 2 (2009), 214–225. [10](#), [15](#)
- [57] KÜCK, U., AND HOFF, B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Applied microbiology and biotechnology* 86, 1 (2010), 51–62. [65](#)
- [58] LEE, I., OH, J.-H., SHWAB, E. K., DAGENAIS, T. R., ANDES, D., AND KELLER, N. P. *HdaA*, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production. *Fungal Genetics and Biology* 46, 10 (2009), 782–790. [11](#)
- [59] LEWIS, Z. A., AND SELKER, E. Chromatin structure and modification. *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi* (2010), 113. [8](#)
- [60] LI, M. H., UNG, P. M., ZAJKOWSKI, J., GARNEAU-TSODIKOVA, S., AND SHERMAN, D. H. Automated genome mining for natural products. *BMC bioinformatics* 10, 1 (2009), 1. [14](#)
- [61] LIRAS, P., AND MARTÍN, J. F. Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *International microbiology* 9, 1 (2006), 9. [7](#)
- [62] LÓPEZ-NIETO, M. J., RAMOS, F. R., LUENGO, J. M., AND MARTÍN, J. F. Characterization of the biosynthesis in vivo of  $\alpha$ -aminoadipyl-cysteinyl-valine in *Penicillium chrysogenum*. *Applied microbiology and biotechnology* 22, 5 (1985), 343–351. [31](#)
- [63] LUGER, K., MÄDER, A. W., RICHMOND, R. K., SARGENT, D. F., AND RICHMOND, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 6648 (1997), 251–260. [8](#)
- [64] MARCIAL-QUINO, J. *Identificación de una aspartato proteasa producida por *Amylomyces rouxii*, silenciamiento del gen que la codifica y efecto sobre la actividad tirosinasa*. PhD thesis, Universidad Autónoma Metropolitana, México. [26](#), [43](#)

- 
- [65] MEDEMA, M. H., BLIN, K., CIMERMANCIC, P., DE JAGER, V., ZAKRZEWSKI, P., FISCHBACH, M. A., WEBER, T., TAKANO, E., AND BREITLING, R. antimash: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research* 39, suppl 2 (2011), W339–W346. [14](#), [28](#)
- [66] MILLER, J. H. Experiments in molecular genetics (*Cold Spring Harbor Laboratory* 1972). [29](#)
- [67] MINUCCI, S., HORN, V., BHATTACHARYYA, N., RUSSANOVA, V., OGRYZKO, V. V., GABRIELE, L., HOWARD, B. H., AND OZATO, K. A histone deacetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in embryonal carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 21 (1997), 11295–11300. [27](#)
- [68] MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., AND ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (1986), vol. 51, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 263–273. [39](#)
- [69] NAKAYASHIKI, H. Rna silencing in fungi: mechanisms and applications. *FEBS letters* 579, 26 (2005), 5950–5957. [18](#)
- [70] NAKAYASHIKI, H., HANADA, S., QUOC, N. B., KADOTANI, N., TOSA, Y., AND MAYAMA, S. Rna silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genetics and Biology* 42, 4 (2005), 275–283. [18](#)
- [71] NORMANSELL, P. J., NORMANSELL, I., AND HOLT, G. Genetic and biochemical studies of mutants of *Penicillium chrysogenum* impaired in penicillin production. *Microbiology* 112, 1 (1979), 113–126. [24](#)
- [72] NÜTZMANN, H.-W., REYES-DOMINGUEZ, Y., SCHERLACH, K., SCHROECKH, V., HORN, F., GACEK, A., SCHÜMANN, J., HERTWECK, C., STRAUSS, J., AND BRAKHAGE, A. A. Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires *Saga/Ada*-mediated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 34 (2011), 14282–14287. [11](#)
- [73] OLA, A. R., THOMY, D., LAI, D., BROTZ-OESTERHELT, H., AND PROKSCH, P. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *Journal of natural products* 76, 11 (2013), 2094–2099. [16](#)
- [74] PALMER, J. M., BOK, J. W., LEE, S., DAGENAIS, T. R., ANDES, D. R., KONTOYIANNIS, D. P., AND KELLER, N. P. Loss of *CclA*, required for histone 3 lysine 4 methylation, decreases growth but increases secondary metabolite production in *Aspergillus fumigatus*. *PeerJ* 1 (2013), e4. [10](#), [15](#), [65](#)

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [75] PALMER, J. M., AND KELLER, N. P. Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Current opinion in microbiology* 13, 4 (2010), 431–436. [8](#)
- [76] PELAEZ, F. Biological activities of fungal metabolites. *Mycology series* 22 (2004), 49–92. [3](#)
- [77] PITT, J. I. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia* (1973), 1135–1157. [29](#)
- [78] PLUSKAL, T., CASTILLO, S., VILLAR-BRIONES, A., AND OREŠIČ, M. Mzmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC bioinformatics* 11, 1 (2010), 1. [29](#)
- [79] QUEENER, S., INGOLIA, T., SKATRUD, P., CHAPMAN, J., AND KASTER, K. A system for genetic transformation of *Cephalosporium acremonium*. *Microbiology* (1985), 468–472. [41](#)
- [80] RAPER, K. B. The development of improved penicillin-producing molds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 48, 2 (1946), 41–56. [7](#)
- [81] RAPER, K. B., ALEXANDER, D. F., AND COGHILL, R. D. Penicillin: Ii. natural variation and penicillin production in *Penicillium notatum* and allied species 1, 2. *Journal of bacteriology* 48, 6 (1944), 639–659. [7](#), [24](#)
- [82] RATEB, M. E., HALLYBURTON, I., HOUSSEN, W. E., BULL, A. T., GOODFELLOW, M., SANTHANAM, R., JASPARS, M., AND EBEL, R. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. *RSC Advances* 3, 34 (2013), 14444–14450. [16](#)
- [83] REYES-DOMINGUEZ, Y., BOK, J. W., BERGER, H., SHWAB, E. K., BASHEER, A., GALLMETZER, A., SCAZZOCCHIO, C., KELLER, N., AND STRAUSS, J. Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* 76, 6 (2010), 1376–1386. [10](#)
- [84] SAMBROOK, J., AND RUSSELL, D. Preparation and analysis of eukaryotic genomic dna. *Molecular cloning: a laboratory manual* 1 (2001), 6–39. [37](#)
- [85] SCHEFFLER, R., COLMER, S., TYNAN, H., DEMAIN, A., AND GULLO, V. Antimicrobials, drug discovery, and genome mining. *Applied microbiology and biotechnology* 97, 3 (2013), 969–978. [19](#)
- [86] SCHERLACH, K., AND HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Organic & biomolecular chemistry* 7, 9 (2009), 1753–1760. [1](#), [19](#)

- 
- [87] SHINOHARA, Y., KAWATANI, M., FUTAMURA, Y., OSADA, H., AND KOYAMA, Y. An overproduction of astellolides induced by genetic disruption of chromatin-remodeling factors in *Aspergillus oryzae*. *The Journal of antibiotics* (2015). [10](#), [15](#), [65](#)
- [88] SHWAB, E. K., BOK, J. W., TRIBUS, M., GALEHR, J., GRAESSLE, S., AND KELLER, N. P. Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic Cell* *6*, 9 (2007), 1656–1664. [11](#), [15](#), [63](#)
- [89] SKINNIDER, M. A., DEJONG, C. A., REES, P. N., JOHNSTON, C. W., LI, H., WEBSTER, A. L., WYATT, M. A., AND MAGARVEY, N. A. Genomes to natural products prediction informatics for secondary metabolomes (PRISM). *Nucleic acids research* *43*, 20 (2015), 9645–9662. [14](#)
- [90] SMITH, G., AND *et al.* An introduction to industrial mycology. *An Introduction to Industrial Mycology.*, 5 (1960). [29](#)
- [91] STARCEVIC, A., ZUCKO, J., SIMUNKOVIC, J., LONG, P. F., CULLUM, J., AND HRANUELI, D. Clustscan: an integrated program package for the semi-automatic annotation of modular biosynthetic gene clusters and in silico prediction of novel chemical structures. *Nucleic acids research* *36*, 21 (2008), 6882–6892. [14](#)
- [92] STERNER, D. E., NATHAN, D., REINDLE, A., JOHNSON, E. S., AND BERGER, S. L. Sumoylation of the yeast *Gcn5* protein. *Biochemistry* *45*, 3 (2006), 1035–1042. [11](#)
- [93] SUBRAMANI, R., AND AALBERSBERG, W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological research* *167*, 10 (2012), 571–580. [16](#)
- [94] TAKEDA, I., UMEMURA, M., KOIKE, H., ASAI, K., AND MACHIDA, M. Motif-independent prediction of a secondary metabolism gene cluster using comparative genomics: application to sequenced genomes of aspergillus and ten other filamentous fungal species. *DNA research* *21*, 4 (2014), 447–457. [5](#)
- [95] TUSCHL, T., ZAMORE, P. D., LEHMANN, R., BARTEL, D. P., AND SHARP, P. A. Targeted mrna degradation by double-stranded rna in vitro. *Genes & development* *13*, 24 (1999), 3191–3197. [18](#)
- [96] ULLÁN, R. V., GODIO, R. P., TELJEIRA, F., VACA, I., GARCÍA-ESTRADA, C., FELTRER, R., KOSALKOVA, K., AND MARTÍN, J. F. Rna-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using  $\beta$ -lactam genes expression. *Journal of microbiological methods* *75*, 2 (2008), 209–218. [18](#), [65](#)
- [97] UMEMURA, M., KOIKE, H., NAGANO, N., ISHII, T., KAWANO, J., YAMANE, N., KOZONE, I., HORIMOTO, K., SHIN-YA, K., ASAI, K., AND *et al.* Middas-m: motif-independent de novo detection of secondary metabolite gene clusters
-

- through the integration of genome sequencing and transcriptome data. *PloS one* 8, 12 (2013), e84028. [14](#)
- [98] VAN DEN BERG, M. A., ALBANG, R., ALBERMANN, K., BADGER, J. H., DARAN, J.-M., DRIESSEN, A. J., GARCIA-ESTRADA, C., FEDOROVA, N. D., HARRIS, D. M., HEIJNE, W. H., AND *et al.* Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nature biotechnology* 26, 10 (2008), 1161–1168. [7](#), [13](#), [20](#), [58](#), [60](#), [66](#)
- [99] WAINWRIGHT, M. *Miracle cure: The story of penicillin and the golden age of antibiotics*. Blackwell, 1990. [3](#)
- [100] WANG, X., SENA FILHO, J. G., HOOVER, A. R., KING, J. B., ELLIS, T. K., POWELL, D. R., AND CICHEWICZ, R. H. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. *Journal of natural products* 73, 5 (2010), 942–948. [16](#), [61](#)
- [101] WEBER, T., BLIN, K., DUDELA, S., KRUG, D., KIM, H. U., BRUCCOLERI, R., LEE, S. Y., FISCHBACH, M. A., MÜLLER, R., WOHLLEBEN, W., AND *et al.* antimash 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic acids research* 43, W1 (2015), W237–W243. [14](#), [29](#)
- [102] WEBER, T., AND KIM, H. U. The secondary metabolite bioinformatics portal: Computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production. *Synthetic and Systems Biotechnology* (2016). [67](#)
- [103] WEBER, T., RAUSCH, C., LOPEZ, P., HOOF, I., GAYKOVA, V., HUSON, D., AND WOHLLEBEN, W. Clusean: a computer-based framework for the automated analysis of bacterial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Journal of biotechnology* 140, 1 (2009), 13–17. [14](#)
- [104] WIEMANN, P., AND KELLER, N. P. Strategies for mining fungal natural products. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 41, 2 (2014), 301–313. [13](#), [18](#)
- [105] WILLIAMS, R. B., HENRIKSON, J. C., HOOVER, A. R., LEE, A. E., AND CICHEWICZ, R. H. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Organic & biomolecular chemistry* 6, 11 (2008), 1895–1897. [1](#), [15](#), [19](#)
- [106] WOLF, T., SHELEST, V., NATH, N., AND SHELEST, E. CASSIS and SMIPS: Promoter-based prediction of secondary metabolite gene clusters in eukaryotic genomes. *Bioinformatics* (2015), btv713. [14](#)
- [107] WU, M.-Y., AND YU, J.-H. Epigenetics of fungal secondary metabolism related genes. In *Martín, J. F., García-Estrada, C., and Zeilinger, S., In Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Volume 2*. Springer, 2015, pp. 29–42. [6](#)

- [108] YANG, X.-L., HUANG, L., AND RUAN, X.-L. Epigenetic modifiers alter the secondary metabolite composition of a plant endophytic fungus, *Pestalotiopsis crassiuscula* obtained from the leaves of *Fragaria chiloensis*. *Journal of Asian natural products research* 16, 4 (2014), 412–417. [62](#)
- [109] YIN, W.-B., CHOOI, Y. H., SMITH, A. R., CACHO, R. A., HU, Y., WHITE, T. C., AND TANG, Y. Discovery of cryptic polyketide metabolites from dermatophytes using heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *ACS synthetic biology* 2, 11 (2013), 629–634. [15](#)
- [110] ZHOU, C., YANG, Y., AND JONG, A. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* 8, 2 (1990), 172–173. [35](#)
- [111] ZIEMERT, N., PODELL, S., PENN, K., BADGER, J. H., ALLEN, E., AND JENSEN, P. R. The natural product domain seeker napdos: a phylogeny based bioinformatic tool to classify secondary metabolite gene diversity. *PLoS One* 7, 3 (2012), e34064. [14](#)
- [112] ZUTZ, C., GACEK, A., SULYOK, M., WAGNER, M., STRAUSS, J., AND RYCHLI, K. Small chemical chromatin effectors alter secondary metabolite production in *Aspergillus clavatus*. *Toxins* 5, 10 (2013), 1723–1741. [16](#), [64](#)



# Apéndices



---

Apéndices A

BLAST

---

## A. BLAST



**Figura A.1:** **a)** Resumen gráfico del Blast (NCBI) de la proteína de *A. nidulans* (AN9399.2) frente a *P. chrysogenum wisconsin 54-1255*, identificando el gen Pc14g00650. **b)** Alineamiento de secuencias de la proteína *A. nidulans* (AN9399.2) contra la proteína identificada en *P. chrysogenum wisconsin 54-1255* (Pc14g00650), presentando un 73% identidad. **c)** Localización genómica de *cclA* (Pc14g00650) en *P. chrysogenum wisconsin 54-1255*.

---

Apéndices B

MZmine2

---

## B. MZMINE2

ID	Average		Identity	Comment	Peak shape	SAZM_LCMSPositivo.mzXML			SAZA3_LCMSPositivo.mzXML			SAZAC_LCMSPositivo.mzXML			
	m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area	
1	437.2041	34.25	Desoxyvindoline			●	3.2E5	4.9E6	●	2.6E5	3.9E6	●			
5	413.2787	55.19				●	1.5E5	7.5E6	●	1.4E5	5.7E6	●			
6	122.0871	1.65				●	1.5E5	1.3E6	●	3.0E5	2.5E6	●			
7	119.0910	34.26				●	1.2E5	1.6E6	●	8.2E4	1.1E6	●			
9	415.2215	34.26				●	1.0E5	1.4E6	●	7.5E4	9.7E5	●			
11	127.0124	34.85				●	5.3E4	1.3E6	●	4.1E4	1.0E6	●			
13	127.0124	33.97				●	4.7E4	9.2E5	●	3.9E4	7.6E5	●			
14	288.2980	32.24				●	4.5E4	4.7E5	●	1.2E4	1.1E5	●			
17	135.0861	34.25				●	3.6E4	4.9E5	●	2.9E4	3.9E5	●			
18	432.2482	34.25				●	3.6E4	3.4E5	●	1.2E4	1.2E5	●			
19	425.3006	47.34				●	3.6E4	5.2E5	●	4.1E4	5.8E5	●			
22	803.5582	55.19				●	2.8E4	7.2E5	●	2.4E4	6.4E5	●			
24	365.1170	1.64	Midodrine			●	2.6E4	3.4E5	●	2.5E4	2.3E5	●			
28	453.1788	34.26				●	2.3E4	3.6E5	●	1.8E4	2.6E5	●			
29	288.2979	31.61				●	2.3E4	2.3E5	●	8.5E3	7.9E4	●			
30	281.1458	34.25				●	2.2E4	2.9E5	●	1.6E4	2.2E5	●			
31	851.4134	34.25				●	2.2E4	2.3E5	●	1.1E4	1.0E5	●			
32	104.0757	1.64				●	2.2E4	2.1E5	●	2.5E4	2.3E5	●			
33	353.2398	27.80				●	2.1E4	2.8E5	●	2.2E4	2.9E5	●			
38	531.2857	34.25				●	1.8E4	1.7E5	●	8.6E3	7.4E4	●			
42	353.2780	47.29				●	1.8E4	2.7E5	●	3.9E4	5.9E5	●			
43	149.0300	55.19				●	1.8E4	5.0E5	●	1.7E4	4.6E5	●			
48	434.2027	34.25				●	1.5E4	1.6E5	●	7.9E3	7.1E4	●			
49	255.1344	33.97				●	1.4E4	2.1E5	●	1.2E4	1.7E5	●			
50	214.9258	57.94	Nummularine F			●	1.4E4	2.6E5	●	1.5E4	2.8E5	●			
51	429.2519	55.19				●	1.3E4	4.1E5	●	1.3E4	4.2E5	●	1.1E4	3.3E5	
55	111.1217	33.99				●	1.3E4	2.2E5	●	1.2E4	1.8E5	●			
57	659.3021	46.96				●	1.3E4	1.3E5	●	1.1E4	1.1E5	●			
60	481.3025	33.40				●	1.2E4	1.3E5	●	1.3E4	1.4E5	●			
61	144.0873	22.33				●	1.2E4	1.4E5	●	1.3E4	1.5E5	●			
64	343.1873	33.99				●	1.1E4	1.4E5	●	8.9E3	1.0E5	●			
66	121.0720	14.29				●	1.1E4	4.3E5	●	1.5E4	5.6E5	●			
67	444.1949	21.56				●	1.1E4	1.4E5	●	9.9E3	1.1E5	●	6.5E3	5.8E4	
72	517.3154	33.98		Cucurbitacin D			●	9.2E3	1.1E5	●	7.3E3	8.8E4	●		
76	315.0898	1.71					●	8.4E3	7.5E4	●	6.5E3	5.9E4	●		
81	455.3450	33.98					●	7.9E3	9.7E4	●	7.3E3	9.4E4	●		
89	250.1853	29.62				●	7.1E3	1.2E5	●	6.7E3	1.1E5	●			
90	255.1349	34.85				●	7.0E3	1.0E5	●	5.9E3	7.8E4	●			
91	335.2283	33.90	Fortimicin AP				●	6.9E3	1.8E5	●	6.2E3	1.7E5	●		
94	144.0028	57.94				●	6.7E3	1.5E5	●	6.6E3	1.7E5	●			
95	107.0899	34.23				●	6.7E3	7.6E4	●	6.1E3	6.8E4	●			
96	335.2284	33.13	Fortimicin AP				●	6.7E3	9.2E4	●	6.2E3	8.6E4	●		
97	515.2750	35.36				●	6.5E3	6.1E4	●	7.9E3	8.2E4	●			

Figura B.1: MZmine1

ID	Average		Identity	C...	Peak shape	SAZAD_LCMSPositive...			SAZAC_LCMSPositive...			SAZAD_LCMSPositive...		
	m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area
4	136.0762	7.94	2-Phenylacetamide			●	9.8E4	4.6E6	●	8.9E4	4.0E6	●	1.1E5	4.9E6
7	413.2683	54.71				●	6.5E4	1.9E6	●	7.1E4	2.1E6	●	7.1E4	2.1E6
10	164.0708	7.90	3-Methylcrotonole			●	5.4E4	2.3E6	●	6.0E4	2.5E6	●	6.0E4	2.5E6
15	295.1511	22.28				●	3.8E4	4.6E5	●	3.8E4	4.7E5	●	4.1E4	1.6E6
18	210.0763	7.98	N-Benzoylcarbamoylglycine			●	3.7E4	1.5E6	●	3.2E4	1.1E5	●	1.2E4	1.1E5
19	226.1806	27.09				●	3.6E4	3.8E5	●	1.2E4	1.0E5	●	1.2E4	1.1E5
25	120.0677	19.20				●	2.8E4	3.4E5	●	4.3E4	5.2E5	●	3.2E4	9.1E5
26	149.0260	54.66	4-Methylthio-2-cyclobutanoic acid			●	2.7E4	8.1E5	●	3.2E4	9.1E5	●	3.2E4	9.1E5
28	398.3401	27.50	Scolandine			●	2.5E4	2.3E5	●	3.6E4	3.5E5	●	3.4E4	3.4E5
33	323.1821	26.72				●	2.3E4	2.3E5	●	4.8E4	5.4E5	●	4.8E4	5.4E5
38	226.1047	19.19				●	2.0E4	2.4E5	●	2.7E4	3.5E5	●	2.7E4	3.5E5
40	121.0655	7.96	Phenylacetalsdehyde			●	1.9E4	8.0E5	●	1.3E4	5.8E5	●	5.9E3	4.2E4
41	266.1716	27.08				●	1.9E4	1.9E5	●	1.9E4	1.9E5	●	1.9E4	1.9E5
42	336.1653	20.37	Isopentenyl adenosine			●	1.9E4	1.9E5	●	2.3E4	2.4E5	●	2.3E4	2.4E5
43	280.0970	19.98	Cravoline			●	1.8E4	3.9E5	●	3.3E4	7.2E5	●	3.3E4	7.2E5
45	323.1824	27.35				●	1.8E4	1.9E5	●	4.4E4	5.0E5	●	4.4E4	5.0E5
48	339.1754	20.53				●	1.7E4	1.6E5	●	1.6E4	1.4E5	●	1.6E4	1.4E5
49	297.1668	23.54				●	1.7E4	1.7E5	●	2.2E4	2.2E5	●	2.2E4	2.2E5
53	297.1217	19.98				●	1.5E4	3.1E5	●	2.7E4	5.9E5	●	2.7E4	5.9E5
55	295.1507	20.89				●	1.5E4	1.8E5	●	1.7E4	2.4E5	●	1.7E4	2.4E5
57	245.1280	20.30	Elonidine			●	1.5E4	1.6E5	●	1.5E4	1.6E5	●	1.5E4	1.6E5
58	102.0557	19.18	1-Aminocyclopropane-1-carboxylate			●	1.5E4	1.7E5	●	2.0E4	2.6E5	●	2.0E4	2.6E5
68	129.0913	22.26	Ethyl tiglate			●	1.3E4	1.2E5	●	1.6E4	1.5E5	●	1.6E4	1.5E5
69	511.2860	27.08				●	1.3E4	1.1E5	●	7.5E3	5.6E4	●	7.4E3	5.9E4
74	119.0505	7.90				●	1.2E4	5.2E5	●	7.1E3	3.0E5	●	1.2E4	4.5E5
75	803.5415	54.70				●	1.2E4	2.5E5	●	1.2E4	2.5E5	●	1.3E4	2.5E5
83	321.1650	23.04				●	1.1E4	1.2E5	●	1.8E4	2.1E5	●	1.8E4	2.1E5
88	341.1113	18.70				●	1.1E4	2.0E5	●	1.2E4	2.5E5	●	1.2E4	2.5E5
91	144.0814	22.02	2-Naphthylamine			●	1.1E4	1.1E5	●	1.3E4	2.7E5	●	1.3E4	2.7E5
92	273.1680	22.26				●	1.1E4	9.2E4	●	1.4E4	1.2E5	●	1.4E4	1.2E5
98	295.1505	21.37				●	1.0E4	1.1E5	●	7.6E3	7.4E4	●	7.6E3	7.4E4
99	148.0759	20.98	3-Methylcrotonole			●	1.0E4	1.2E5	●	1.3E4	1.7E5	●	1.3E4	1.7E5
100	204.1237	20.38	Nε-(isobutyl)isopentenyl adenine			●	9.6E3	8.7E4	●	1.2E4	1.0E5	●	1.2E4	1.0E5
103	265.1044	21.92				●	9.3E3	9.4E4	●	6.6E3	6.1E4	●	6.6E3	6.1E4
107	305.1722	28.70	Discodermine			●	8.9E3	8.8E4	●	1.7E4	1.8E5	●	1.2E4	1.3E5
112	321.1650	22.45				●	8.6E3	7.8E4	●	1.4E4	1.4E5	●	1.4E4	1.4E5
114	132.1025	25.51	L-Leucine			●	8.5E3	8.3E4	●	8.3E3	8.5E4	●	8.3E3	8.5E4
115	151.0398	21.42	alpha-Oxo-benzoacetic acid			●	8.5E3	7.5E4	●	1.3E4	1.3E5	●	1.3E4	1.3E5
116	152.0529	22.15				●	8.4E3	1.2E5	●	9.2E3	1.4E5	●	9.2E3	1.4E5
118	284.1382	20.88	Brevianamide F			●	8.3E3	8.0E4	●	1.1E4	1.1E5	●	1.1E4	1.1E5
122	130.0554	20.87	Isoguairolone			●	8.2E3	8.9E4	●	8.4E3	9.7E4	●	8.4E3	9.7E4
137	377.3204	52.54				●	7.2E3	3.5E5	●	7.1E3	8.7E4	●	8.9E3	4.6E5
140	132.1015	17.66	L-Leucine			●	7.1E3	8.1E4	●	7.1E3	8.7E4	●	7.1E3	8.7E4
147	393.2988	54.92	Chenodioscytolate			●	6.7E3	1.5E5	●	6.7E3	1.5E5	●	8.1E3	1.8E5
154	277.1195	18.98				●	6.5E3	5.6E4	●	7.0E3	5.9E4	●	7.0E3	5.9E4
162	227.1398	17.00	Penicillibital			●	6.4E3	8.1E4	●	1.0E4	1.2E5	●	1.0E4	1.2E5
170	149.0273	40.98	4-Methylthio-2-cyclobutanoic acid			●	3.1E5	6.1E6	●	3.1E5	6.1E6	●	2.9E5	5.6E6
171	301.1446	41.00	Toxyl arginate			●	1.9E5	4.3E6	●	2.0E5	4.3E6	●	2.0E5	4.3E6
172	387.1952	33.73				●	1.6E5	2.4E6	●	1.5E5	2.3E6	●	1.5E5	2.3E6
173	124.0416	2.30				●	9.0E4	7.7E5	●	1.2E5	9.7E5	●	1.2E5	9.7E5
176	415.2136	34.15	Magrostin			●	6.6E4	1.1E6	●	6.0E4	8.8E5	●	6.0E4	8.8E5
177	425.2901	47.17	alpha-Phocacetic acid			●	5.4E4	7.8E5	●	4.8E4	6.9E5	●	4.8E4	6.9E5
178	119.0881	34.16				●	5.1E4	7.2E5	●	4.1E4	5.9E5	●	4.1E4	5.9E5
180	205.0705	1.64	3-O-Ethyl-L-ascorbic acid			●	4.8E4	2.6E5	●	1.8E4	1.1E5	●	1.8E4	1.1E5
181	118.0885	1.69				●	4.8E4	4.7E5	●	1.5E4	1.3E5	●	1.5E4	1.3E5
183	437.1953	34.15				●	3.9E4	7.5E5	●	3.9E4	7.1E5	●	3.9E4	7.1E5
185	124.0414	1.92				●	3.8E4	5.2E5	●	4.8E4	7.0E5	●	4.8E4	7.0E5
189	304.3024	35.81				●	3.2E4	3.4E5	●	2.7E4	3.0E5	●	2.7E4	3.0E5
190	332.3341	38.78				●	3.2E4	3.5E5	●	3.2E4	3.5E5	●	3.2E4	3.5E5
195	331.1316	33.71				●	2.8E4	3.9E5	●	3.0E4	4.0E5	●	3.0E4	4.0E5
196	381.2396	51.18				●	2.7E4	5.3E5	●	4.3E4	8.3E5	●	4.3E4	8.3E5
197	409.1765	33.74	Becdomethasone			●	2.7E4	4.6E5	●	2.7E4	4.8E5	●	2.7E4	4.8E5

Figura B.2: MZmine2

## B. MZMINE2

ID	Average		Identity	C...	Peak shape	SAZAO_LCMSPositivo...			SAZAC_LCMSPositivo...			SAZAD_LCMSPositivo...		
	m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area
198	79.0225	1.84				●	2.6E4	4.6E5	●	2.6E4	4.4E5	●	2.6E4	4.4E5
199	493.2816	35.27	Mucronine B			●	2.6E4	3.7E5	●	2.5E4	3.5E5	●	2.5E4	3.5E5
200	133.0524	1.73				●	2.5E4	2.7E5	●	9.2E3	8.2E4	●	9.2E3	8.2E4
202	509.2736	31.03				●	2.3E4	2.8E5	●	2.3E4	2.7E5	●	2.3E4	2.7E5
204	548.2822	30.84				●	2.3E4	2.6E5	●	2.0E4	2.3E5	●	2.0E4	2.3E5
205	432.2400	34.15				●	2.2E4	3.1E5	●	1.8E4	2.4E5	●	1.8E4	2.4E5
206	121.0342	40.99				●	2.1E4	3.8E5	●	2.0E4	3.5E5	●	2.0E4	3.5E5
208	532.2920	34.48				●	2.1E4	2.8E5	●	2.0E4	2.5E5	●	2.0E4	2.5E5
210	421.2347	39.95				●	2.0E4	2.9E5	●	3.9E4	4.7E5	●	3.9E4	4.7E5
213	608.5096	37.26				●	1.9E4	2.5E5	●	1.8E4	2.5E5	●	1.8E4	2.5E5
214	165.0592	7.96				●	1.9E4	8.0E5	●	1.9E4	7.9E5	●	1.9E4	7.9E5
217	564.4832	37.23				●	1.8E4	1.9E5	●	1.8E4	1.6E5	●	1.8E4	1.6E5
218	288.2908	32.30				●	1.8E4	1.9E5	●	1.8E4	1.8E5	●	1.8E4	1.8E5
221	353.2701	47.15	Montanol			●	1.7E4	2.3E5	●	2.4E4	3.2E5	●	2.4E4	3.2E5
223	284.2986	49.59				●	1.7E4	2.8E5	●	1.8E4	2.9E5	●	1.8E4	2.9E5
224	652.5345	37.30				●	1.7E4	2.2E5	●	1.6E4	2.1E5	●	1.6E4	2.1E5
225	135.0837	34.15				●	1.7E4	2.3E5	●	1.9E4	1.8E5	●	1.9E4	1.8E5
226	399.2527	39.95	Triisobutylethylphosphate			●	1.6E4	2.3E5	●	2.7E4	3.8E5	●	2.7E4	3.8E5
227	531.2727	34.15				●	1.5E4	1.5E5	●	1.1E4	1.1E5	●	1.1E4	1.1E5
228	579.2947	41.00				●	1.5E4	2.8E5	●	1.5E4	2.8E5	●	1.5E4	2.8E5
230	520.4574	37.17				●	1.5E4	1.6E5	●	1.9E4	1.2E5	●	1.9E4	1.2E5
231	288.2901	31.69				●	1.5E4	1.5E5	●	1.4E4	1.4E5	●	1.4E4	1.4E5
234	476.4312	37.38				●	1.4E4	1.5E5	●	1.2E4	1.2E5	●	1.2E4	1.2E5
235	520.4578	37.45				●	1.4E4	1.4E5	●	1.1E4	1.2E5	●	1.1E4	1.2E5
237	437.1957	32.82				●	1.3E4	1.7E5	●	9.0E3	1.1E5	●	9.0E3	1.1E5
241	200.2041	36.73				●	1.3E4	1.8E5	●	1.1E4	1.6E5	●	1.1E4	1.6E5
242	316.3233	35.57				●	1.3E4	1.3E5	●	8.8E3	8.3E4	●	8.8E3	8.3E4
244	432.4055	37.27				●	1.2E4	1.7E5	●	1.1E4	1.0E5	●	1.1E4	1.0E5
248	131.0715	2.96	4-Methyl-2-oxopentanoate			●	1.2E4	1.6E5	●	1.7E4	2.6E5	●	1.7E4	2.6E5
250	281.1411	34.16				●	1.2E4	1.7E5	●	1.0E4	1.4E5	●	1.0E4	1.4E5
251	100.0779	4.04				●	1.2E4	2.9E5	●	1.6E4	3.8E5	●	1.6E4	3.8E5
252	696.5604	37.33				●	1.2E4	1.6E5	●	1.1E4	1.6E5	●	1.1E4	1.6E5
255	530.3858	40.97				●	1.1E4	1.3E5	●	7.2E3	7.3E4	●	7.2E3	7.3E4
258	182.0813	7.93	L-Tyrosine			●	1.1E4	4.7E5	●	1.2E4	4.6E5	●	1.2E4	4.6E5
261	301.2011	26.71				●	1.1E4	9.3E4	●	9.6E3	7.5E4	●	9.6E3	7.5E4
262	284.2986	50.32				●	1.1E4	2.0E5	●	9.7E3	1.7E5	●	9.7E3	1.7E5
265	773.3765	33.72				●	1.1E4	1.0E5	●	1.2E4	1.1E5	●	1.2E4	1.1E5
267	301.2014	27.35				●	1.1E4	8.7E4	●	8.8E3	6.5E4	●	8.8E3	6.5E4
269	636.5395	40.10				●	1.1E4	1.4E5	●	1.1E4	1.4E5	●	1.1E4	1.4E5
271	564.4838	37.50				●	1.0E4	1.1E5	●	9.6E3	9.8E4	●	9.6E3	9.8E4
273	515.2630	35.31				●	1.0E4	1.7E5	●	1.1E4	1.7E5	●	1.1E4	1.7E5
274	360.3649	41.44				●	1.0E4	9.5E4	●	1.1E4	1.0E5	●	1.1E4	1.0E5
275	476.4305	37.09				●	1.0E4	9.6E4	●	9.4E3	8.2E4	●	9.4E3	8.2E4
278	388.3790	37.21				●	9.8E3	8.8E4	●	7.5E3	6.8E4	●	7.5E3	6.8E4
280	592.5141	40.08				●	9.8E3	1.0E5	●	9.3E3	9.5E4	●	9.3E3	9.5E4
281	239.1636	33.90				●	9.7E3	1.3E5	●	9.9E3	1.3E5	●	9.9E3	1.3E5
283	235.1730	38.48				●	9.6E3	1.4E5	●	1.1E4	1.7E5	●	1.1E4	1.7E5
289	504.4639	40.27				●	9.2E3	8.8E4	●	9.1E3	8.7E4	●	9.1E3	8.7E4
290	313.1150	18.72	Vicianose			●	9.2E3	1.9E5	●	1.0E4	2.0E5	●	1.0E4	2.0E5
292	358.3710	40.10				●	8.9E3	9.0E4	●	8.7E3	8.2E4	●	8.7E3	8.2E4
293	345.2541	29.70				●	8.9E3	7.8E4	●	8.8E3	7.6E4	●	8.8E3	7.6E4
294	548.4889	40.04				●	8.7E3	8.3E4	●	7.9E3	7.3E4	●	7.9E3	7.3E4
295	680.5669	40.12				●	8.6E3	1.0E5	●	8.8E3	1.1E5	●	8.8E3	1.1E5
298	123.0447	7.93	Bercate			●	8.4E3	3.5E5	●	1.1E4	4.1E5	●	1.1E4	4.1E5
299	460.4368	40.20				●	8.3E3	7.9E4	●	7.4E3	6.6E4	●	7.4E3	6.6E4
300	453.1663	34.15				●	8.2E3	1.3E5	●	7.2E3	1.1E5	●	7.2E3	1.1E5
301	239.1641	34.75				●	8.2E3	1.4E5	●	8.8E3	1.4E5	●	8.8E3	1.4E5
313	310.3138	50.11				●	7.5E3	1.2E5	●	7.0E3	1.1E5	●	7.0E3	1.1E5
318	463.3040	42.43	3-Dihydrocyclopone			●	7.1E3	1.2E5	●	5.9E3	8.7E4	●	5.9E3	8.7E4
319	740.5863	37.32				●	7.0E3	1.1E5	●	6.7E3	9.2E4	●	6.7E3	9.2E4
321	548.4896	40.32				●	6.8E3	7.2E4	●	7.3E3	7.4E4	●	7.3E3	7.4E4
327	113.0607	14.55	Cyclohexane-1,3-dione			●	6.6E3	1.8E5	●	8.8E3	2.0E5	●	8.8E3	2.0E5

Figura B.3: MZmine3

ID	Average		Identity	C...	Peak shape	SAZAD_LCMSPositive...			SAZAC_LCMSPositive...			SAZAD_LCMSPositive...		
	m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area
333	299.1663	39.96				●			●	6.2E3	7.2E4	●	1.0E4	1.4E5
340	146.0598	19.97	3-Methylmaleic anhydride			●			●	5.9E3	1.0E5	●	5.4E3	9.9E4

Figura B.4: MZmine4

## B. MZMINE2

ID	Average		Identity	C...	Peak shape	SAZA@_LCMSPositive...			SAZA@_LCMSPositive...			SAZAB_LCMSPositive...		
	m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area
4	136.0765	8.04	2-Phenylacetamide			●	9.8E4	4.6E6	●	1.2E5	5.8E6	●		
6	338.3439	55.36				●	8.0E4	2.4E6	●	5.0E4	1.5E6	●		
7	413.2689	54.70				●	6.5E4	1.9E6	●	8.2E4	2.4E6	●		
9	415.2090	34.16				●	6.3E4	9.3E5	●	8.0E4	1.3E6	●		
11	302.1420	41.00				●	4.2E4	9.0E5	●	3.9E4	8.2E5	●		
12	387.1699	33.74				●	4.1E4	5.9E5	●	1.5E5	2.1E6	●		
13	200.2005	36.74	Dodecanamide			●	4.1E4	6.3E5	●	1.4E4	2.1E5	●		
14	119.0855	34.15	alpha-Methylstyrene			●	4.0E4	5.5E5	●	6.1E4	9.0E5	●		
15	295.1504	22.27				●	3.8E4	4.8E5	●	4.1E4	5.4E5	●		
17	437.1905	34.16				●	3.8E4	7.2E5	●	4.1E4	8.3E5	●		
20	211.1442	18.23				●	3.6E4	4.7E5	●	4.0E4	5.2E5	●		
21	121.0315	41.00	3-Methylthio-propanoate			●	3.6E4	6.5E5	●	2.4E4	4.2E5	●		
22	239.1602	33.89				●	3.2E4	5.6E5	●	8.0E3	1.1E5	●		
25	120.0675	19.19				●	2.8E4	3.4E5	●	4.1E4	4.9E5	●		
26	149.0264	54.67	4-Methylthio-2-cyclobutanoic acid			●	2.7E4	8.1E5	●	3.7E4	1.1E6	●		
27	296.0909	18.69				●	2.7E4	5.4E5	●	2.9E4	6.4E5	●		
28	388.3392	27.52				●	2.5E4	2.3E5	●	4.0E4	3.9E5	●		
29	432.2350	34.16				●	2.5E4	3.1E5	●	2.4E4	3.3E5	●		
32	493.2754	35.28				●	2.3E4	3.1E5	●	2.5E4	3.5E5	●		
33	323.1809	26.72				●	2.3E4	2.3E5	●	3.9E4	4.3E5	●		
34	316.3192	35.57				●	2.2E4	2.3E5	●	1.9E4	2.1E5	●		
38	226.1047	19.18				●	2.0E4	2.4E5	●	2.2E4	2.8E5	●		
39	239.1603	34.74				●	1.9E4	4.3E5	●	7.4E3	1.2E5	●		
40	121.0656	8.01	Phenylacetaldehyde			●	1.9E4	8.0E5	●	2.4E4	1.1E6	●		
42	336.1652	20.38	Isopentenyl adenosine			●	1.9E4	1.9E5	●	2.4E4	2.4E5	●		
43	280.0967	19.97	Gravoline			●	1.9E4	3.9E5	●	1.6E4	3.9E5	●		
47	579.2890	41.01				●	1.8E4	3.6E5	●	1.7E4	3.1E5	●		
48	339.1751	20.54				●	1.7E4	1.6E5	●	2.1E4	2.0E5	●		
49	297.1662	23.54				●	1.7E4	1.7E5	●	2.3E4	2.2E5	●		
53	297.1215	19.98				●	1.5E4	3.1E5	●	1.3E4	3.0E5	●		
54	135.0805	34.15	Indan-1-ol			●	1.5E4	2.0E5	●	2.0E4	2.9E5	●		
55	295.1505	20.89				●	1.5E4	1.8E5	●	1.9E4	2.5E5	●		
56	316.3187	35.02				●	1.5E4	1.6E5	●	1.3E4	1.4E5	●		
57	245.1280	20.30	Elonidate			●	1.5E4	1.6E5	●	1.8E4	2.0E5	●		
58	102.0557	19.19	1-Aminocyclopropane-1-carboxylate			●	1.5E4	1.7E5	●	2.1E4	2.6E5	●		
59	205.0853	40.99	3-Butylidene-7-hydroxyphthalide			●	1.4E4	2.6E5	●	7.4E3	1.1E5	●		
62	399.2476	39.96				●	1.4E4	1.9E5	●	2.8E4	4.0E5	●		
65	243.1331	17.66				●	1.4E4	1.6E5	●	1.7E4	2.0E5	●		
66	421.2292	39.96				●	1.4E4	1.8E5	●	3.9E4	5.6E5	●		
67	332.3290	38.82				●	1.4E4	1.4E5	●	2.1E4	2.3E5	●		
68	129.0910	22.26	Ethyl tiglate			●	1.3E4	1.2E5	●	1.9E4	2.0E5	●		
70	182.0817	7.95	L-Tyrosine			●	1.3E4	5.1E5	●	1.5E4	6.9E5	●		
71	532.2863	34.48				●	1.3E4	1.6E5	●	1.6E4	2.1E5	●		
73	204.1223	19.17				●	1.2E4	1.4E5	●	1.9E4	2.2E5	●		
75	803.5422	54.68				●	1.2E4	2.5E5	●	1.8E4	3.9E5	●		
78	325.1156	19.98	Levolurazidone			●	1.2E4	2.3E5	●	1.1E4	2.3E5	●		
79	347.0983	19.99				●	1.2E4	3.3E5	●	8.7E3	2.6E5	●		
80	297.1661	21.78				●	1.2E4	1.3E5	●	1.8E4	2.2E5	●		
81	268.0962	18.67				●	1.1E4	2.3E5	●	1.4E4	2.7E5	●		
82	281.1376	34.16	Autumnolide			●	1.1E4	1.6E5	●	1.4E4	2.2E5	●		
84	237.0721	17.89				●	1.1E4	1.5E5	●	1.5E4	2.1E5	●		
87	515.2574	35.29				●	1.1E4	1.7E5	●	9.6E3	1.6E5	●		
88	341.1114	18.70				●	1.1E4	2.0E5	●	1.2E4	2.5E5	●		
89	409.1723	33.74				●	1.1E4	1.5E5	●	2.3E4	3.9E5	●		
91	144.0811	22.02	2-Naphthylamine			●	1.1E4	1.1E5	●	1.3E4	2.4E5	●		
92	273.1675	22.26				●	1.1E4	9.2E4	●	1.5E4	1.4E5	●		
94	437.1905	32.81				●	1.0E4	1.3E5	●	1.5E4	2.0E5	●		
96	252.1012	19.99				●	1.0E4	2.0E5	●	8.4E3	2.0E5	●		
98	295.1502	21.38				●	1.0E4	1.1E5	●	9.6E3	1.1E5	●		
99	148.0756	20.99	3-Methylcrotonolide			●	1.0E4	1.2E5	●	1.2E4	1.5E5	●		
100	204.1236	20.39	Ni-(delta2-Isopentenyl)-adenine			●	9.6E3	8.7E4	●	1.3E4	1.2E5	●		
102	304.2970	35.82				●	9.3E3	9.2E4	●	1.4E4	1.5E5	●		

Figura B.5: MZmine5

ID	Average		Identity	C...	Peak shape	SAZA@_LCMSPositiv...			SAZAB@_LCMSPositiv...		
	m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height	Area
105	363.0921	18.64				●	9.2E3	2.6E5	●	9.5E3	2.7E5
110	381.2948	51.22				●	8.8E3	1.6E5	●	9.7E4	2.1E6
112	321.1643	22.45				●	8.6E3	7.8E4	●	1.2E4	1.1E5
113	211.1439	19.00				●	8.6E3	9.1E4	●	9.4E3	1.0E5
114	132.1017	25.51	L-Leucine			●	8.5E3	8.3E4	●	8.4E3	8.2E4
115	151.0394	21.43	alpha-Ono-benzoacetic acid			●	8.5E3	7.5E4	●	1.3E4	1.2E5
116	152.0525	22.15				●	8.4E3	1.2E5	●	1.1E4	1.7E5
118	284.1378	20.87	Brevianamide F			●	8.3E3	8.0E4	●	1.1E4	1.1E5
119	437.1903	34.82				●	8.3E3	1.3E5	●	1.3E4	2.4E5
122	130.0649	20.87	Isoquinoline			●	8.2E3	8.9E4	●	9.1E3	1.1E5
123	313.1163	18.66	Fluprimidol			●	8.2E3	1.5E5	●	8.8E3	1.7E5
125	531.2666	34.15				●	7.8E3	6.5E4	●	2.3E4	2.4E5
126	331.1273	33.74	Mirazanthin III			●	7.7E3	8.9E4	●	2.9E4	4.0E5
135	235.1690	38.46	Balkenolide A			●	7.2E3	1.0E5	●	1.1E4	1.7E5
138	279.1553	26.69				●	7.1E3	1.2E5	●	1.1E4	2.2E5
140	132.1017	17.66	L-Leucine			●	7.1E3	8.1E4	●	8.6E3	1.0E5
141	321.1641	24.48				●	7.0E3	8.0E4	●	7.3E3	1.1E5
142	275.1836	21.77				●	7.0E3	5.2E4	●	1.7E4	1.6E5
144	284.2946	50.35	Octadecanamide			●	6.9E3	1.1E5	●	9.7E3	1.6E5
147	393.2996	54.92	Chenodeoxycholate			●	6.7E3	1.5E5	●	9.0E3	2.3E5
149	453.1612	34.16				●	6.6E3	1.1E5	●	8.6E3	1.5E5
154	277.1192	18.98				●	6.5E3	5.6E4	●	7.6E3	6.3E4
156	243.1333	16.78				●	6.5E3	7.7E4	●	7.6E3	9.6E4
157	339.1753	20.11				●	6.5E3	5.6E4	●	8.8E3	8.0E4
164	299.1616	39.97				●	6.1E3	7.1E4	●	1.2E4	1.6E5
167	284.2940	49.61	Octadecanamide			●	5.7E3	8.8E4	●	7.5E3	1.1E5
216	312.3282	56.36				●			●	1.0E4	3.3E5
233	773.3858	33.72				●			●	9.0E3	7.9E4
263	119.0850	34.81	alpha-Methylstyrene			●			●	6.6E3	7.7E4
267	164.0958	2.86				●			●	6.4E3	7.0E4

Figura B.6: MZmine6

## B. MZMINE2

ID	Average		Identity	C...	Peak shape	TSA0_LCMSPositvo...			TSAB_LCMSPositvo...			TSA@_LCMSPositvo...			
	m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area	
7	338.3388	55.39				●	7.1E4	2.1E6	●	9.3E4	2.9E6	●			
37	381.2940	51.24				●	2.3E4	4.5E5	●	2.8E4	5.5E5	●			
94	284.2933	49.65				●	1.2E4	2.1E5	●	5.9E3	8.7E4	●			
139	284.2934	50.39	Octadecanamide			●	8.9E3	1.5E5	●	7.8E3	1.3E5	●			
141	125.1327	43.88				●	8.3E3	8.7E4	●	6.0E3	5.9E4	●			
185	391.2803	54.64				●	5.9E3	1.1E5	●	8.7E3	1.7E5	●			
203	124.0419	2.30				●			●	5.7E4	4.7E5	●	3.4E5	3.0E6	
206	200.2021	36.74				●			●	4.3E4	7.1E5	●	1.9E4	1.9E5	
219	124.0415	1.91				●			●	2.8E4	3.9E5	●	1.8E5	2.3E4	
225	118.0884	1.69				●			●	2.5E4	2.4E5	●	2.6E4	2.6E5	
226	133.0521	1.73				●			●	2.5E4	2.8E5	●	2.4E4	2.6E5	
229	119.0867	34.15	alpha Methylstyrene			●			●	2.4E4	3.0E5	●	5.5E4	8.0E5	
230	343.1245	1.70	Sucrose			●			●	2.3E4	2.2E5	●	9.4E3	7.1E4	
231	383.1153	1.64				●			●	2.3E4	1.6E5	●	8.9E3	4.8E4	
239	179.0570	1.73				●			●	2.0E4	2.2E5	●	1.7E4	1.8E5	
240	316.3207	35.57				●			●	1.9E4	2.2E5	●	1.2E4	1.3E5	
242	421.2317	39.95				●			●	1.9E4	2.8E5	●	5.9E4	8.6E5	
249	399.2500	39.96	Triisobutylethylphosphate			●			●	1.6E4	2.3E5	●	5.4E4	7.7E5	
251	332.3313	38.79				●			●	1.6E4	1.7E5	●	6.6E4	7.1E5	
253	544.3612	40.73				●			●	1.6E4	1.6E5	●	6.1E4	6.6E5	
256	530.3830	40.96				●			●	1.5E4	1.7E5	●	3.7E4	4.4E5	
272	177.0421	1.80				●			●	1.3E4	1.5E5	●	1.4E4	1.3E5	
276	530.3830	41.59				●			●	1.2E4	1.5E5	●	8.6E3	1.0E5	
285	358.3680	40.10				●			●	1.1E4	1.1E5	●	8.9E3	8.2E4	
314	393.3144	41.44				●			●	8.3E3	8.2E4	●	1.9E4	2.2E5	
320	284.3324	39.02				●			●	8.0E3	8.7E4	●	9.3E3	1.0E5	
332	496.5174	41.39				●			●	6.9E3	1.5E5	●	6.4E3	1.5E5	
343	360.3629	41.44				●			●	6.3E3	5.9E4	●	1.8E4	1.8E5	
344	130.0511	2.32				●			●	6.3E3	4.4E4	●	2.6E4	2.2E5	

Figura B.7: MZmine7

ID	Average		Identity	C...	Peak shape	TSA_3.mzXML			Bco.mzXML			TSA_4.mzXML			TSA_M.mzXML		
	m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area
1	413.2376	43.54				●	8.0E5	2.3E7	●	6.6E5	2.1E7	●					
2	381.2696	41.51				●	7.8E5	7.8E4	●	3.2E5	2.8E6	●	6.0E5	5.9E6	●	7.4E5	7.5E6
5	214.9026	48.83				●	3.2E5	9.6E4	●	3.1E5	9.1E6	●			●		
6	353.2408	38.43				●	2.2E5	1.0E6	●	6.4E4	5.1E5	●	1.9E5	1.6E6	●	2.4E5	1.9E6
8	393.2687	43.64				●	2.0E5	4.3E6	●	2.0E5	4.6E6	●			●		
9	365.1101	33.10				●	1.9E5	5.7E4	●	2.0E5	5.9E6	●	2.3E5	7.0E6	●	2.0E5	6.3E6
10	301.1194	33.84	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid			●	1.7E5	2.4E6	●	1.7E5	2.3E6	●	2.0E5	2.9E6	●	1.7E5	2.5E6
12	453.1349	28.62				●	1.6E5	1.6E6	●	1.1E5	9.5E5	●	9.8E4	8.5E5	●	1.3E5	1.2E6
13	84.9520	48.86				●	1.3E5	3.9E4	●	1.9E5	3.8E6	●			●		
14	252.1061	0.11				●	1.3E5	8.5E5	●	1.9E5	8.5E5	●			●	1.3E5	8.7E5
15	358.1403	0.11				●	1.2E5	8.0E5	●	1.2E5	8.0E5	●			●	1.2E5	8.0E5
16	382.1342	0.11				●	1.1E5	8.0E5	●	1.2E5	8.4E5	●	4.8E4	3.1E5	●	1.3E5	9.5E5
20	239.1447	27.90				●	1.0E5	1.0E6	●	1.0E5	1.1E6	●	1.4E5	1.4E6	●	1.0E5	1.1E6
22	739.5489	41.51				●	9.6E4	8.2E5	●	2.7E4	1.9E5	●	6.8E4	5.4E5	●	9.0E4	7.7E5
34	377.2911	46.60				●	8.9E4	1.8E6	●			●	1.4E5	9.0E6	●		
25	134.9318	1.15				●	8.8E4	3.3E6	●	8.8E4	6.5E6	●	9.9E4	4.3E6	●	9.1E4	5.1E6
27	319.1705	38.80				●	8.7E4	7.6E5	●			●	1.0E5	1.0E6	●		
30	415.2063	38.43				●	8.0E4	7.6E5	●	3.1E4	2.5E5	●	7.2E4	6.6E5	●	8.7E4	8.1E5
31	322.0290	0.12				●	7.9E4	5.4E5	●	7.9E4	5.5E5	●			●	7.0E4	4.8E5
32	621.9879	0.12				●	7.8E4	5.5E5	●	7.9E4	5.6E5	●			●		
36	140.9067	48.83				●	7.1E4	1.6E6	●	7.0E4	1.7E6	●	6.5E4	1.5E6	●	6.5E4	1.5E6
38	515.2248	29.76	Nomin			●	6.6E4	5.5E5	●			●	5.0E4	3.9E5	●	3.5E4	2.3E5
39	239.1447	28.50				●	6.5E4	6.5E5	●	6.8E4	5.9E5	●	9.7E4	9.9E5	●	7.0E4	6.0E5
42	284.3112	35.69				●	6.3E4	8.2E5	●	6.3E4	8.1E5	●			●		
43	130.9916	38.43				●	6.2E4	5.7E5	●	2.9E4	1.8E5	●	5.5E4	4.9E5	●	6.6E4	6.1E5
44	443.2400	41.51				●	6.2E4	7.5E5	●	4.0E4	3.9E5	●			●	6.1E4	6.9E5
45	295.1732	40.31				●	6.1E4	8.0E5	●	5.2E4	8.2E5	●	5.8E4	8.1E5	●	5.5E4	7.5E5
47	209.1861	0.12				●	6.0E4	4.0E5	●	6.0E4	3.9E5	●			●	5.5E4	3.7E5
49	149.0125	43.56				●	5.7E4	1.1E6	●	4.6E4	9.0E5	●	8.1E4	2.9E6	●	6.5E4	1.3E6
90	457.2443	32.58				●	5.6E4	4.8E5	●			●	1.1E5	9.8E5	●	5.3E4	4.5E5
51	304.2788	32.08				●	5.6E4	5.5E5	●	5.9E4	6.2E5	●			●		
52	130.9919	41.51				●	5.5E4	6.8E5	●	3.9E4	3.7E5	●	4.6E4	5.5E5	●	5.0E4	6.6E5
53	126.9978	28.51				●	5.4E4	6.6E5	●	5.5E4	6.8E5	●	6.9E4	8.5E5	●	5.8E4	8.0E5
56	803.4838	43.53				●	5.0E4	6.6E5	●	3.4E4	4.2E5	●			●		
57	409.1337	0.12				●	5.0E4	3.6E5	●	5.3E4	3.8E5	●			●	5.6E4	4.1E5
58	267.2489	41.51				●	4.7E4	5.2E5	●	2.1E4	2.4E5	●			●		
60	218.8842	48.83				●	4.3E4	9.9E5	●	4.2E4	9.6E5	●			●		
61	332.3074	35.79				●	4.2E4	5.2E5	●	4.1E4	5.0E5	●			●		
62	170.9141	48.85				●	4.2E4	8.7E5	●	3.9E4	8.6E5	●			●		
63	126.9984	27.94				●	4.0E4	5.0E5	●	4.1E4	4.5E5	●			●		
65	98.9679	48.87				●	3.9E4	1.3E6	●	3.9E4	1.4E6	●			●		
66	921.9488	0.12				●	3.8E4	2.6E5	●	3.9E4	2.6E5	●			●	3.4E4	2.4E5
68	338.3164	46.39				●	3.6E4	6.1E5	●	1.6E4	2.5E5	●	3.2E4	5.6E5	●		
69	254.1189	0.12	Cinnamyl anthranilate			●	3.6E4	2.5E5	●	3.6E4	2.5E5	●			●		
72	350.2333	38.44				●	3.5E4	2.6E5	●			●			●	4.0E4	3.2E5
75	267.1442	37.23				●	3.4E4	3.9E5	●	3.2E4	4.1E5	●			●		
76	321.1889	40.81				●	3.3E4	4.8E5	●	3.0E4	4.4E5	●			●		
78	518.3075	41.38				●	3.3E4	4.9E5	●	3.0E4	4.8E5	●	3.3E4	5.2E5	●	3.2E4	4.2E5
79	562.3310	41.19				●	3.2E4	5.0E5	●	3.2E4	5.7E5	●	3.3E4	5.6E5	●	3.3E4	5.8E5
80	503.0126	0.12				●	3.2E4	2.1E5	●	3.3E4	2.1E5	●			●		
81	540.3195	41.29				●	3.2E4	5.1E5	●			●	3.4E4	5.2E5	●		
82	135.0700	28.65				●	3.2E4	2.4E5	●	1.6E4	1.1E5	●			●		
84	532.3244	44.82				●	3.0E4	7.5E5	●	3.0E4	8.1E5	●			●	2.8E4	6.8E5
90	553.3470	41.52				●	2.8E4	1.7E6	●			●	4.0E4	2.2E6	●		
91	393.2677	0.12				●	2.8E4	1.9E5	●			●			●	2.8E4	1.9E5
92	354.2081	40.30	Spiradine			●	2.7E4	3.6E5	●	2.3E4	2.9E5	●			●		
93	353.2091	40.30				●	2.7E4	3.7E5	●	2.5E4	3.2E5	●	2.8E4	3.1E5	●		
94	584.3418	41.07				●	2.7E4	5.2E5	●	2.6E4	4.7E5	●	3.0E4	5.3E5	●	2.9E4	4.9E5
96	496.2955	41.47	Mibtradi			●	2.6E4	4.3E5	●	3.0E4	4.4E5	●	2.7E4	4.3E5	●	2.6E4	4.1E5
97	598.3567	44.46				●	2.5E4	8.7E5	●	2.6E4	7.7E5	●	2.6E4	7.6E5	●	2.5E4	7.8E5
99	606.3542	40.99				●	2.5E4	4.6E5	●	2.3E4	4.4E5	●	2.6E4	4.1E5	●		
100	510.3083	44.94	Acetylbroviline			●	2.5E4	6.0E5	●	2.5E4	5.7E5	●	2.2E4	5.5E5	●	2.2E4	5.4E5
101	659.2368	39.50				●	2.5E4	2.1E5	●	2.3E4	2.0E5	●	5.2E4	4.8E5	●	6.3E4	5.6E5

Figura B.8: MZmine8

B. MZMINE2

ID	Average		Identity	C...	Peak shape	TSA_3.mzXML			Bco.mzXML			TSA_4.mzXML			TSA_M.mzXML		
	m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area
104	395.2845	0.11				●	2.3E4	1.6E5	●	2.5E4	1.6E5	●	2.6E4	1.7E5	●	2.6E4	1.7E5
105	595.3325	34.75				●	2.2E4	4.0E5	●	2.2E4	3.7E5	●	2.8E4	5.2E5	●	2.5E4	4.1E5
108	301.1114	27.91				●	2.0E4	1.9E5	●	2.0E4	1.9E5	●	2.4E4	2.5E5	●	2.4E4	2.5E5
110	474.2847	41.61				●	2.0E4	2.8E5	●	2.2E4	3.7E5	●	2.4E4	2.5E5	●	2.4E4	2.5E5
111	488.3001	45.04				●	2.0E4	4.8E5	●	1.9E4	4.0E5	●	1.8E4	3.9E5	●	1.8E4	3.9E5
112	639.3575	34.69				●	2.0E4	3.3E5	●	2.0E4	3.3E5	●	2.4E4	3.5E5	●	2.4E4	3.5E5
115	295.1716	38.44				●	1.9E4	1.8E5	●	1.9E4	1.8E5	●	1.8E4	3.0E5	●	2.1E4	2.3E5
116	293.1586	38.24				●	1.9E4	2.1E5	●	1.8E4	2.1E5	●	1.8E4	3.0E5	●	1.7E4	2.0E5
117	576.8457	44.59				●	1.8E4	4.9E5	●	1.8E4	4.9E5	●	1.7E4	4.0E5	●	1.7E4	4.0E5
118	650.3772	40.77				●	1.7E4	2.8E5	●	1.6E4	2.7E5	●	1.4E4	8.4E4	●	1.4E4	8.4E4
119	801.5165	41.50				●	1.7E4	1.2E5	●	1.7E4	1.2E5	●	1.4E4	8.4E4	●	1.4E4	8.4E4
120	160.9789	33.11				●	1.7E4	4.1E5	●	1.7E4	4.1E5	●	1.9E4	4.6E5	●	1.7E4	4.4E5
123	210.9736	0.15				●	1.6E4	1.9E5	●	1.7E4	1.9E5	●	1.8E4	2.7E5	●	1.7E4	1.3E5
127	683.3809	34.64				●	1.5E4	2.1E5	●	1.5E4	2.0E5	●	1.8E4	2.7E5	●	1.8E4	2.7E5
131	554.2324	29.19				●	1.4E4	1.0E5	●	1.4E4	1.0E5	●	1.9E4	1.5E5	●	1.5E4	1.1E5
132	661.4343	42.16	12-O-Palmitoyl-16-hydroxyphorbol 13-acetate			●	1.4E4	1.5E5	●	1.4E4	1.5E5	●	1.6E4	1.9E5	●	1.6E4	1.9E5
133	325.1831	37.22	Piperonyl sulfide			●	1.4E4	1.3E5	●	1.4E4	1.3E5	●	1.5E4	1.6E5	●	1.5E4	1.6E5
136	871.5782	43.57	X-206			●	1.3E4	1.9E5	●	1.3E4	1.9E5	●	1.3E4	2.2E5	●	1.3E4	2.2E5
137	437.1612	38.61	Sargenon A			●	4.3E5	3.9E6	●	4.3E5	3.9E6	●	4.0E5	3.6E6	●	5.2E5	4.9E6
138	441.2648	46.24				●	1.3E5	1.4E7	●	1.3E5	1.4E7	●	1.3E5	1.2E7	●	1.3E5	1.2E7
139	339.3200	47.69				●	1.1E5	4.4E7	●	1.1E5	4.4E7	●	1.6E5	5.1E7	●	1.6E5	5.1E7
143	142.9913	48.82				●	7.7E4	2.4E6	●	7.7E4	2.4E6	●	7.5E4	2.8E6	●	7.5E4	2.8E6
147	143.9857	48.79				●	5.8E4	4.4E6	●	5.8E4	4.4E6	●	5.9E4	5.3E6	●	5.9E4	5.3E6
149	224.0771	0.12				●	4.7E4	3.1E5	●	4.7E4	3.1E5	●	4.6E4	3.1E5	●	4.6E4	3.1E5
155	301.1110	28.49				●	3.7E4	4.1E5	●	3.7E4	4.1E5	●	4.9E4	5.6E5	●	3.9E4	4.5E5
161	540.3171	41.28				●	3.2E4	5.0E5	●	3.2E4	5.0E5	●	3.2E4	4.7E5	●	3.2E4	4.7E5
163	365.0799	0.80				●	3.1E4	1.7E5	●	3.1E4	1.7E5	●	3.4E4	2.0E5	●	3.4E4	2.0E5
170	507.2842	34.87				●	2.5E4	4.0E5	●	2.5E4	4.0E5	●	2.6E4	4.6E5	●	2.6E4	4.6E5
173	620.3686	44.36				●	2.2E4	6.9E5	●	2.2E4	6.9E5	●	2.4E4	7.8E5	●	2.4E4	7.8E5
177	200.6718	48.84				●	1.9E4	3.7E5	●	1.9E4	3.7E5	●	1.7E4	3.5E5	●	1.7E4	3.5E5
179	97.9828	48.79				●	1.7E4	1.9E6	●	1.7E4	1.9E6	●	1.7E4	2.2E6	●	1.7E4	2.2E6
181	119.0761	28.62				●	1.5E4	8.2E4	●	1.5E4	8.2E4	●	1.9E4	1.2E5	●	1.9E4	1.2E5
184	413.2354	43.59				●	9.0E5	4.4E7	●	9.0E5	4.4E7	●	7.9E5	3.5E7	●	7.9E5	3.5E7
186	214.9018	48.81				●	3.0E5	8.8E6	●	3.0E5	8.8E6	●	3.0E5	8.9E6	●	3.0E5	8.9E6
188	393.2664	43.68				●	2.2E5	5.1E6	●	2.2E5	5.1E6	●	2.1E5	5.1E6	●	2.1E5	5.1E6
194	84.9518	48.81				●	1.2E5	3.1E6	●	1.2E5	3.1E6	●	1.2E5	3.3E6	●	1.2E5	3.3E6
198	421.2952	45.89				●	9.9E4	7.2E6	●	9.9E4	7.2E6	●	9.6E4	7.2E6	●	9.6E4	7.2E6
199	335.1937	31.30				●	9.4E4	5.9E5	●	9.4E4	5.9E5	●	9.5E4	2.4E5	●	9.5E4	2.4E5
204	803.4782	43.60				●	6.8E4	9.5E5	●	6.8E4	9.5E5	●	5.0E4	6.8E5	●	5.0E4	6.8E5
205	557.4031	41.51				●	6.7E4	5.6E5	●	6.7E4	5.6E5	●	8.5E4	7.1E5	●	8.5E4	7.1E5
208	284.3117	35.48				●	5.7E4	6.5E5	●	5.7E4	6.5E5	●	5.1E4	6.5E5	●	5.1E4	6.5E5
214	267.2474	41.51				●	4.4E4	6.3E5	●	4.4E4	6.3E5	●	4.6E4	5.5E5	●	4.6E4	5.5E5
219	218.8839	48.81				●	4.0E4	8.2E5	●	4.0E4	8.2E5	●	4.3E4	8.6E5	●	4.3E4	8.6E5
221	170.9132	48.81				●	3.9E4	8.1E5	●	3.9E4	8.1E5	●	3.8E4	8.3E5	●	3.8E4	8.3E5
223	98.9672	48.79				●	3.8E4	1.3E6	●	3.8E4	1.3E6	●	3.9E4	1.5E6	●	3.9E4	1.5E6
229	548.4382	47.55				●	3.1E4	1.8E6	●	3.1E4	1.8E6	●	2.6E4	1.4E6	●	2.6E4	1.4E6
231	586.4338	43.71				●	3.1E4	8.3E5	●	3.1E4	8.3E5	●	4.0E4	1.0E6	●	4.0E4	1.0E6
233	267.1427	37.20				●	3.0E4	3.6E5	●	3.0E4	3.6E5	●	3.0E4	3.2E5	●	3.0E4	3.2E5
234	429.2086	43.59				●	3.0E4	5.2E5	●	3.0E4	5.2E5	●	2.5E4	4.1E5	●	2.5E4	4.1E5
236	621.9823	0.10				●	2.7E4	1.7E5	●	2.7E4	1.7E5	●	6.6E4	4.5E5	●	6.6E4	4.5E5
237	354.2056	40.30	Spirodine			●	2.7E4	3.2E5	●	2.7E4	3.2E5	●	2.5E4	2.7E5	●	2.5E4	2.7E5
241	284.2710	42.28				●	2.4E4	3.1E5	●	2.4E4	3.1E5	●	2.1E4	2.6E5	●	2.1E4	2.6E5
242	628.3623	40.89				●	2.1E4	3.6E5	●	2.1E4	3.6E5	●	2.2E4	3.7E5	●	2.2E4	3.7E5
246	167.0228	43.61				●	1.9E4	3.3E5	●	1.9E4	3.3E5	●	1.6E4	2.6E5	●	1.6E4	2.6E5
247	474.2824	41.61				●	1.9E4	2.8E5	●	1.9E4	2.8E5	●	1.9E4	3.1E5	●	1.9E4	3.1E5
251	650.3736	40.78				●	1.8E4	2.9E5	●	1.8E4	2.9E5	●	1.6E4	2.8E5	●	1.6E4	2.8E5
252	363.0678	33.82				●	1.8E4	1.6E5	●	1.8E4	1.6E5	●	1.6E4	1.4E5	●	1.6E4	1.4E5
263	749.4825	41.96				●	1.5E4	1.7E5	●	1.5E4	1.7E5	●	1.4E4	1.4E5	●	1.4E4	1.4E5
264	727.4026	34.55				●	1.5E4	1.9E5	●	1.5E4	1.9E5	●	1.3E4	1.6E5	●	1.3E4	1.6E5

Figura B.9: MZmine9

ID	Average		Identity	C...	Peak shape	Bco.mzXML			TSA_E.mzXML			TSA_P.mzXML			TSA_D.mzXML		
	m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area
1	413.2366	43.57				●	6.6E5	2.1E7	●	1.1E6	3.4E7	●	1.1E6	3.1E7	●		
2	437.1631	28.64				●	4.3E5	3.9E6	●	5.3E5	4.9E6	●	4.8E5	4.5E6	●	4.3E5	3.9E6
3	381.2697	41.51				●	3.2E5	2.8E6	●	8.7E5	9.2E6	●	9.9E5	1.1E7	●		
4	214.9024	48.81				●	3.1E5	9.1E6	●	3.1E5	8.9E6	●	3.1E5	8.9E6	●		
5	365.1105	33.11				●	2.0E5	5.9E6	●	2.1E5	6.6E6	●	2.0E5	5.8E6	●		
6	393.2676	43.68				●	2.0E5	4.6E6	●	2.0E5	4.3E6	●	2.0E5	4.3E6	●		
7	301.1196	33.86	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid			●	1.7E5	2.3E6	●	1.9E5	2.7E6	●	1.8E5	2.4E6	●		
8	441.2654	46.20				●	1.3E5	1.4E7	●			●	1.3E5	1.3E7	●	5.0E4	4.3E6
9	252.1062	0.12	Muramic acid			●	1.3E5	8.5E5	●	1.9E5	8.8E5	●	1.3E5	8.6E5	●	1.2E5	7.9E5
10	84.9520	48.85				●	1.3E5	3.8E6	●	1.9E5	3.6E6	●	1.3E5	3.5E6	●		
11	358.1402	0.12				●	1.2E5	8.0E5	●	1.2E5	8.1E5	●	1.2E5	8.0E5	●	1.2E5	7.9E5
12	382.1340	0.12				●	1.2E5	8.4E5	●	1.2E5	8.5E5	●	1.2E5	8.3E5	●	1.1E5	8.0E5
15	453.1354	28.65				●	1.1E5	9.5E5	●			●	1.2E5	1.1E6	●		
16	239.1452	27.93				●	1.0E5	1.1E6	●	1.1E5	1.1E6	●	1.0E5	1.0E6	●	1.0E5	1.0E6
18	134.9319	1.15				●	8.6E4	6.5E6	●			●	8.7E4	6.5E6	●		
20	322.0263	0.12				●	7.9E4	5.5E5	●	7.8E4	5.5E5	●	7.9E4	5.5E5	●	7.7E4	5.3E5
21	621.9862	0.12				●	7.9E4	5.6E5	●	7.8E4	5.5E5	●	7.6E4	5.4E5	●	7.8E4	5.4E5
22	142.9912	48.83				●	7.7E4	2.4E6	●	7.6E4	3.0E6	●	7.9E4	2.7E6	●		
24	140.9009	48.82				●	7.0E4	1.7E6	●	6.8E4	1.6E6	●	7.0E4	1.7E6	●		
25	239.1452	28.53				●	6.8E4	5.9E5	●	6.8E4	8.2E5	●	7.2E4	5.4E5	●	6.9E4	7.9E5
28	353.2417	38.44				●	6.4E4	5.1E5	●	2.8E5	2.4E6	●	3.9E5	3.5E6	●	2.5E5	2.2E6
29	294.3111	35.65				●	6.3E4	8.1E5	●			●	6.3E4	8.1E5	●		
30	209.1860	0.12				●	6.0E4	3.9E5	●	6.0E4	4.0E5	●	6.0E4	4.0E5	●		
31	304.2793	32.07				●	5.9E4	6.2E5	●			●	6.5E4	6.7E5	●	5.9E4	5.6E5
32	143.9862	48.77				●	5.8E4	4.4E6	●			●	5.6E4	4.2E6	●		
33	126.9980	28.54				●	5.5E4	6.8E5	●			●	5.5E4	7.9E5	●		
34	394.2730	43.67				●	5.3E4	1.0E6	●			●	5.2E4	1.1E6	●		
35	406.1337	0.12				●	5.3E4	3.8E5	●	5.4E4	4.0E5	●	5.4E4	3.9E5	●	5.1E4	3.7E5
36	295.1731	40.31				●	5.2E4	8.2E5	●	5.7E4	9.3E5	●	5.8E4	8.5E5	●	6.0E4	8.1E5
37	224.0774	0.12				●	4.7E4	3.1E5	●			●	4.7E4	3.1E5	●	4.2E4	2.8E5
38	149.0127	43.57				●	4.6E4	9.0E5	●	9.2E4	1.9E6	●	8.8E4	1.5E6	●		
39	686.3882	44.08				●	4.5E4	7.8E6	●			●	3.6E4	6.7E6	●		
42	126.9984	27.93				●	4.1E4	4.5E5	●	4.3E4	4.7E5	●	4.2E4	4.6E5	●	4.3E4	5.2E5
43	332.3077	35.79				●	4.1E4	5.0E5	●			●	4.6E4	5.6E5	●	4.4E4	5.9E5
44	443.2408	41.51	Citrobifagin			●	4.0E4	3.9E5	●			●			●	6.0E4	8.4E5
46	98.9677	48.85				●	3.9E4	1.4E6	●	3.9E4	1.3E6	●			●	4.0E4	1.3E6
48	435.1369	0.12				●	3.9E4	2.6E5	●	3.7E4	2.4E5	●	4.0E4	2.6E5	●	3.7E4	2.4E5
49	921.9484	0.12				●	3.9E4	2.6E5	●	3.8E4	2.7E5	●	3.9E4	2.8E5	●	4.0E4	2.7E5
51	301.1113	28.53				●	3.7E4	4.1E5	●			●	3.8E4	4.9E5	●		
52	130.9921	41.53				●	3.6E4	3.7E5	●	5.3E4	7.3E5	●	5.6E4	8.1E5	●	5.0E4	8.1E5
54	254.1192	0.12				●	3.6E4	2.5E5	●			●			●	3.5E4	2.4E5
55	589.4699	45.17				●	3.5E4	1.4E7	●	3.7E4	1.5E7	●			●		
57	803.4815	43.56				●	3.4E4	4.2E5	●	1.1E5	1.5E6	●	1.1E5	1.5E6	●		
58	554.3379	44.73				●	3.4E4	1.1E6	●			●	3.4E4	1.1E6	●		
60	503.0120	0.12				●	3.3E4	2.1E5	●	3.1E4	2.0E5	●	3.1E4	2.1E5	●		
61	267.1446	37.23				●	3.2E4	4.1E5	●			●	3.1E4	3.4E5	●	3.5E4	3.6E5
62	540.3180	41.28				●	3.2E4	5.0E5	●	3.3E4	5.3E5	●	3.4E4	5.3E5	●	3.4E4	5.3E5
63	562.3311	41.18				●	3.2E4	5.7E5	●	3.3E4	5.7E5	●	3.3E4	5.6E5	●	3.2E4	5.3E5
65	365.0804	0.80				●	3.1E4	1.7E5	●			●	2.7E4	1.6E5	●		
66	415.2068	38.44				●	3.1E4	2.5E5	●	9.9E4	9.6E5	●	1.2E5	1.2E6	●	1.1E5	1.0E6
67	518.3082	41.38				●	3.0E4	4.8E5	●	3.3E4	4.6E5	●	3.3E4	4.3E5	●	3.5E4	5.6E5
68	532.3239	44.84				●	3.0E4	8.1E5	●			●	2.9E4	7.5E5	●		
70	321.1890	40.81				●	3.0E4	4.4E5	●			●	3.2E4	4.7E5	●	3.2E4	4.1E5
73	393.2691	0.12				●	2.7E4	1.8E5	●	2.7E4	1.9E5	●	2.7E4	1.8E5	●	2.7E4	1.8E5
75	739.5489	41.51				●	2.7E4	1.9E5	●	1.2E5	1.0E6	●	1.4E5	1.3E6	●	8.2E4	6.9E5
76	455.4280	43.02				●	2.6E4	9.4E6	●	2.7E4	9.1E6	●			●		
78	598.3581	44.45				●	2.6E4	7.7E5	●	2.5E4	7.6E5	●			●	2.8E4	9.0E5
79	584.3418	41.07				●	2.6E4	4.7E5	●	2.6E4	4.2E5	●	2.8E4	4.8E5	●	2.9E4	5.0E5
80	507.2845	34.89				●	2.5E4	4.0E5	●			●	3.1E4	4.8E5	●		
82	510.3093	44.92				●	2.5E4	5.7E5	●	2.5E4	5.7E5	●			●	3.0E4	7.4E5
83	395.2843	0.12				●	2.5E4	1.6E5	●	2.6E4	1.7E5	●	2.5E4	1.7E5	●		
84	228.9171	48.81				●	2.4E4	8.8E5	●	2.5E4	8.2E5	●	2.3E4	5.1E5	●		
86	354.2076	40.30	Spirodine			●	2.3E4	2.9E5	●	2.6E4	2.6E5	●	2.7E4	3.2E5	●		

Figura B.10: MZmine10

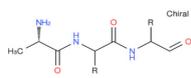
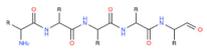
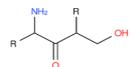
B. MZMINE2

ID	Average		Identity	C...	Peak shape	Bco.mzXML			TSA_E.mzXML		TSA_P.mzXML		TSA_D.mzXML	
	m/z	RT				Status	Height	Area	Status	Height	Area	Status	Height	Area
87	606.3544	40.99				●	2.3E4	4.4E5	●	2.6E4	4.6E5	●	2.6E4	4.6E5
88	130.9920	38.44				●	2.3E4	1.8E5	●	7.5E4	7.2E5	●	9.3E4	8.9E5
89	659.2369	39.51				●	2.3E4	2.0E5	●	7.2E4	6.7E5	●	6.5E4	5.9E5
90	474.2848	41.60				●	2.2E4	3.7E5	●			●	2.1E4	3.5E5
91	620.3689	44.35				●	2.2E4	6.9E5	●	2.3E4	6.8E5	●	2.4E4	7.5E5
92	595.3329	34.76				●	2.2E4	3.7E5	●			●	2.5E4	4.3E5
94	267.2484	41.52				●	2.1E4	2.4E5	●	5.5E4	5.8E5	●	6.1E4	7.0E5
96	664.3933	44.24				●	2.0E4	7.0E5	●			●	1.9E4	6.6E5
99	488.2998	45.06				●	1.9E4	4.0E5	●			●	1.9E4	4.2E5
100	293.1984	38.23				●	1.8E4	2.1E5	●	1.9E4	2.1E5	●	1.9E4	2.0E5
101	382.1334	28.82				●	1.8E4	1.2E5	●			●	1.8E4	1.2E5
102	97.9831	48.80				●	1.7E4	1.9E6	●	1.7E4	2.0E6	●	1.7E4	1.9E6
103	160.9794	33.12				●	1.7E4	4.1E5	●			●	1.7E4	4.5E5
104	210.9740	0.15				●	1.7E4	1.3E5	●	1.8E4	1.4E5	●	1.7E4	1.3E5
105	650.3760	40.77				●	1.6E4	2.7E5	●	1.7E4	2.7E5	●	1.8E4	2.9E5
106	338.3164	46.41				●	1.6E4	2.5E5	●	3.3E4	5.1E5	●		
108	554.8341	44.69				●	1.6E4	4.1E5	●	1.7E4	4.3E5	●	1.7E4	4.3E5
109	119.0764	28.64				●	1.5E4	8.2E4	●	1.9E4	1.2E5	●	1.6E4	1.0E5
110	683.3730	34.65				●	1.5E4	2.0E5	●	1.9E4	2.8E5	●	1.7E4	2.1E5
114	457.2445	32.61				●			●	2.6E5	2.4E6	●	2.6E5	2.3E6
115	347.0769	17.70	Tomartín			●			●	2.0E5	4.4E6	●	2.0E5	3.9E6
116	453.1366	28.65				●			●	1.3E5	1.2E6	●	1.1E5	9.3E5
121	557.4055	41.51				●			●	1.1E5	9.6E5	●	1.4E5	1.3E6
122	378.2643	41.53				●			●	1.0E5	1.1E6	●	1.1E5	1.2E6
123	511.2542	23.52				●			●	9.5E4	6.4E5	●		
124	421.2955	45.85				●			●	9.4E4	6.5E6	●	9.2E4	6.7E6
126	481.3317	41.55	Bombarvine			●			●	7.7E4	2.7E7	●	7.2E4	2.6E7
132	499.3398	41.54				●			●	5.9E4	7.9E6	●	5.2E4	1.2E7
135	205.0536	0.78				●			●	5.0E4	3.4E5	●	7.0E4	4.2E5
136	126.9987	28.54				●			●	5.0E4	8.7E5	●		
137	350.2344	38.44	AMD 670			●			●	5.2E4	4.1E5	●	8.9E4	7.0E5
140	425.1859	36.16	Cindartamycin			●			●	4.1E4	3.8E5	●	4.1E4	3.9E5
143	429.2097	43.55				●			●	3.7E4	6.5E5	●	3.6E4	6.8E5
145	254.1174	0.12	Progantel			●			●	3.7E4	2.6E5	●	3.7E4	2.6E5
149	643.2437	43.94				●			●	3.3E4	5.0E5	●	3.3E4	4.8E5
151	507.2876	34.89				●			●	3.3E4	4.7E5	●		
152	551.3110	34.82	Hordeatine A			●			●	3.3E4	4.9E5	●	2.7E4	4.0E5
153	463.2628	34.90				●			●	3.1E4	4.8E5	●	2.8E4	4.8E5
156	138.9530	50.54				●			●	3.0E4	4.3E6	●	3.1E4	4.3E6
157	527.2478	21.08				●			●	2.9E4	1.7E5	●		
158	553.3479	47.88				●			●	2.9E4	1.0E6	●	3.6E4	1.3E6
162	639.3598	34.70				●			●	2.5E4	3.7E5	●	2.2E4	3.2E5
164	341.2428	36.03				●			●	2.5E4	2.1E5	●		
167	369.2061	38.44				●			●	2.3E4	2.2E5	●	2.7E4	2.7E5
168	295.1736	38.44				●			●	2.3E4	2.6E5	●		
169	284.2737	42.29				●			●	2.2E4	2.6E5	●	2.1E4	2.5E5
171	135.0705	28.64				●			●	2.1E4	1.4E5	●		
172	628.3630	40.90				●			●	2.1E4	3.5E5	●	2.1E4	3.6E5
174	429.2860	35.92				●			●	2.0E4	1.6E5	●	1.4E4	1.1E5
175	267.1663	22.87				●			●	2.0E4	2.9E5	●		
176	320.0659	18.35				●			●	2.0E4	1.4E5	●		
179	363.0881	33.85				●			●	1.8E4	1.6E5	●	1.8E4	1.7E5
180	783.5111	43.62				●			●	1.8E4	2.3E5	●	1.8E4	2.2E5
181	382.1367	28.83				●			●	1.8E4	1.2E5	●		
184	390.1657	22.26				●			●	1.6E4	8.7E4	●		
185	400.3495	40.33				●			●	1.6E4	2.4E5	●	1.6E4	2.6E5
188	360.3354	40.07				●			●	1.5E4	1.9E5	●	1.5E4	1.8E5
190	325.1827	37.23	Piperonyl sulfide			●			●	1.4E4	1.4E5	●		
202	116.9235	1.15				●			●			●	1.0E5	3.9E6
205	515.2260	29.78	Nomilin			●			●	4.8E4	3.6E5	●	2.8E4	1.9E5
219	288.2709	27.88				●			●			●	3.4E4	2.4E5
224	576.3473	44.61				●			●			●	3.0E4	8.4E5
228	337.0823	29.69				●			●			●	2.8E4	2.2E5

Figura B.11: MZmine11

## Apéndices C

# antiSMASH

Número	Tipo	Compuesto producido por la similitud del Cluster de genes	Función de la proteína putativa con mayor similitud	ORF correspondiente en <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	Predicción de estructura
1	tPKS		Beta cetoacil sintasa fuerte similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM164 genomic scaffold, ProqFM164S01, w. (85% de identidad)	Pc13g04470 Pc13g04360 Pc13g04520	
2	NRPS		simintasa dependiente de AMP y ligasa fuerte similitud con la proteína en <i>Penicillium italicum</i> strain PHI-1 contig1290, w.g. (85% de identidad)	Pc13g05250 Pc13g05260 Pc13g05320	
3	tPKS		Beta cetoacil sintasa similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM164 genomic scaffold, ProqFM164S02, w... (80% de identidad)	Pc13g08690 Pc13g08570	
4	sideróforo		$\beta/\alpha$ pliegues de proteína hidrolasa similitud con la proteína en <i>Penicillium italicum</i> strain PHI-1 contig1550, w.g.(33% de identidad)	Pc13g11500 Pc13g11520 Pc13g11580 Pc13g11610	
5	Terpeno		similitud con la proteína en <i>Penicillium expansum</i> strain d1 contig147, w. g. (58% de identidad)	Pc13g12200 Pc13g12220 Pc13g12270	
6	Otro		similitud con la proteína en <i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1 1099423829805 genomic scaffold, wh... (60% de identidad)	Pc13g12440 Pc13g12450 Pc13g12480 Pc13g12570 Pc13g12580	
7	NRPS		Contiene dominio de proteína de condensación similitud con la proteína en <i>Microsporium canis</i> CBS 113480 supercont1.8 genomic scaffold, wh... (23% de identidad)	Pc13g14330 Pc13g14440 Pc13g14430	
8	tPKS		Sintetasa dependiente de AMP y ligasa similitud con la proteína en <i>Penicillium expansum</i> strain MD-8 contig220, whole genome s... (12% de identidad)	Pc12g05520 Pc12g05590 Pc12g05510 Pc12g05530 Pc12g05600	
9	Terpeno	PR Toxina	fuerte similitud con la proteína en <i>Stachybotrys chartarum</i> IBT 40293 unplaced genomic scaffold sca... (81% identidad)	Pc12g06300 Pc12g06310 Pc12g06320 Pc12g06330 Pc12g06340 Pc12g06350	
10	Otro		similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM164 genomic scaffold, ProqFM164S04, w... (41%)	Pc12g09740 Pc12g09840 Pc12g09880 Pc12g09980	
11	tPKS		similitud con la proteína en <i>Aureobasidium pullulans</i> var. pullulans EXF-150 unplaced genomi... (30% de identidad)	Pc12g11520 Pc12g11530 Pc12g11540	

**Figura C.1:** antiSMASH1

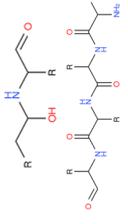
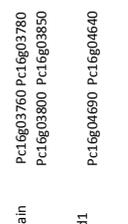
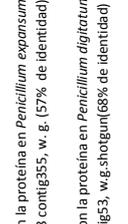
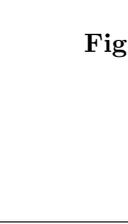
Número	Tipo	Compuesto producido por la similitud del Cluster de genes	Función de la proteína putativa con mayor similitud	OHF correspondiente en <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	Predicción de estructura
12	Otro		similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM1164 genomic scaffold, ProqFM164503 (72% de identidad)	Pc12g13080 Pc12g13170 Pc12g13190	
13	t1PKS	yanuthone	Beta cetoacil sintasa Fuerte similitud con la proteína en <i>Penicillium digitatum</i> Pd1 contig298, W. g. shogtun (90% de identidad)	Pc16g00130 Pc16g00370 Pc16g00450 Pc16g00710	
14	t1PKS-NRPS		similitud con la proteína en <i>Penicillium expansum</i> strain MD-8 contig355, w. g. (57% de identidad)	Pc16g03760 Pc16g03780 Pc16g03800 Pc16g03850	
15	NRPS		similitud con la proteína en <i>Penicillium digitatum</i> Pd1 contig53, w.g.shogtun(68% de identidad)	Pc16g04690 Pc16g04640	
16	T1pks		similitud con la proteína en <i>Aspergillus niger</i> contig An15c0180, genomic contig. (25% de identidad)	Pc16g04890 Pc16g04830 Pc16g04870	
17	Otro		similitud con la proteína en <i>Penicillium expansum</i> strain MD-8 contig378, w. g.(35% de identidad)	Pc16g09870 Pc16g09900 Pc16g09910 Pc16g09920 Pc16g09930	
18	T1pks		similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM1164 genomic scaffold, ProqFM164501, (61% de identidad)	Pc16g11480 Pc16g11280 Pc16g11240	
19	t1PKS-NRPS		similitud con la proteína en <i>Penicillium expansum</i> strain MD-8 contig192, w.e.g. (35% de identidad)	Pc16g13930 Pc16g13920	
20	Otro		similitud con la proteína en <i>Trichophyton rubrum</i> CBS 202.88 unplaced genomic scaffold super... (20% de identidad)	Pc06g01500 Pc06g01520 Pc06g01540	
21	t1PKS-NRPS	cytochalasin E	similitud con la proteína en <i>Penicillium expansum</i> strain MD-8 contig220, w. g.(77% de identidad)	Pc14g00080 Pc14g00090 Pc14g00190 Pc14g00230	
22	Ácido graso		similitud con la proteína en <i>Ophiostoma piceae</i> UAMH 11346 chromosome Unknown scf21, w. g. (25% de identidad)	Pc14g00740 Pc14g00750 Pc14g00790	
23	Otro		similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM1164 genomic scaffold, ProqFM164503, (68% de identidad)	Pc14g01740 Pc14g01770 Pc14g01790	
24	Otro		fuerte similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM1164 genomic scaffold, ProqFM164503, w... (86% de identidad)	Pc18g00027 Pc18g00360 Pc18g00380	

Figura C.2: antiSMASH2

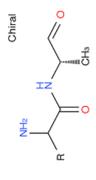
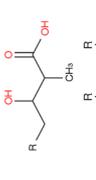
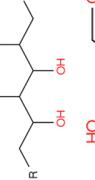
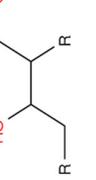
Número	Tipo	Compuesto producido por la similitud del Cluster de genes	Función de la proteína putativa con mayor similitud	OF <sub>2</sub> correspondiente en <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	Predicción de estructura
25	Terpeno	afiatrem	similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM164 genomic scaffold, ProqFM164S01 (33% de identidad)	Pc20g01800 Pc20g01840 Pc20g01860	
26	Otro		similitud con la proteína en <i>Penicillium expansum</i> strain d1 contig154, w. g. sho (80% de identidad)	Pc20g02260 Pc20g02270 Pc20g02290 Pc20g02320	
27	Otro		similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM164 genomic scaffold, ProqFM164S02, (61% de identidad)	Pc20g02490 Pc20g02590 Pc20g02630	
28	Otro		similitud con la proteína en <i>Bardonia compnicensis</i> UAMH 10762 unplaced genomic scaffold (20% de identidad)	Pc20g096680 Pc20g09690 Pc20g09760	
29	Terpeno		similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM164 genomic scaffold, ProqFM164S02 (35% de identidad)	Pc20g10840 Pc20g10860 Pc20g10870 Pc20g10940	
30	Terpeno		similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM164 genomic scaffold, ProqFM164S02 (35% de identidad)	Pc20g10840 Pc20g10860 Pc20g10870 Pc20g10940	
31	Otro		similitud con la proteína en <i>Penicillium expansum</i> strain d1 contig29, w. g. shot (40% de identidad)	Pc20g12650 Pc20g12670 Pc20g12690	
32	t1PKS		similitud con la proteína en <i>Macrophomina phaseolina</i> MS6 contig00324, w. g. shot. (2.3% de identidad)	Pc21g00960 Pc21g00910 Pc21g00900	
33	NRPS		similitud con la proteína en <i>Penicillium expansum</i> strain d1 contig174, w. g. sho.(16% de identidad)	Pc21g01700 Pc21g01710	
34	t1PKS		similitud con la proteína en <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181.109943763622 genomic scaffold. (52% de identidad)	Pc21g03930 Pc21g03990 Pc21g04030	
35	t1PKS		fuerte similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM164 genomic scaffold, ProqFM164S02, (81% de identidad)	Pc21g04840 Pc21g0570 Pc21g05080	
36	t1PKS		similitud con la proteína en <i>Trichoderma reesei</i> QM6a unplaced genomic scaffold TRRE.scaffo.(33% de identidad)	Pc21g05070 Pc21g05080	

Figura C.3: antiSMASH3

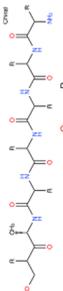
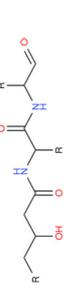
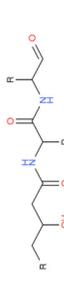
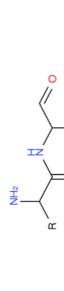
Número	Tipo	Compuesto producido por la similitud del Cluster de genes	Función de la proteína putativa con mayor similitud	OHF correspondiente en <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	Predicción de estructura
37	Terpeno-NRPS-ácido graso		similitud con la proteína en <i>Aspergillus oryzae</i> 3.042 Contig245, w. g.shoigun s(56% de identidad)	Pc21g10790 Pc21g10820 Pc21g10840 Pc21g10870	
38	t1PKS	Trans-resorcylyde	similitud con la proteína en <i>Penicillium italicum</i> strain PHI-1 contig768, w. g. (34% de identidad)	Pc21g12170 Pc21g12260 Pc21g12440 Pc21g12450 Pc21g12630	
39	NRPS	Trans-resorcylyde	similitud con la proteína en <i>Penicillium italicum</i> strain PHI-1 contig768, w. g. (34% de identidad)	Pc21g12170 Pc21g12260 Pc21g12440 Pc21g12450 Pc21g12630	
40	Terpeno		similitud con la proteína en <i>Penicillium expansum</i> strain MD-8 contig273, whole genome s... (62% de identidad)	Pc21g13930 Pc21g14140 Pc21g14020 Pc21g14060	
41	t1PKS		similitud con la proteína en <i>Aspergillus clavatus</i> NRRL1 1099423829750 genomic scaffold, (27% de identidad)	Pc21g14980 Pc21g15040 Pc21g15160	
42	indole-NRPS	RoquefortineC/meleagri	similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM164 genomic scaffold, ProqFM164501, (55% de identidad)	Pc21g15480	
43	t1PKS		Fuerte similitud con la proteína en <i>Penicillium italicum</i> strain PHI-1 contig365, w. g. (92% de identidad)	Pc21g16000	
44	Otro		similitud con la proteína en <i>Colletotrichum fioriniae</i> P17 Scaffold 2.1, w. g.sh. (14% de identidad)	Pc21g22650 Pc21g22660	
45	Otro		similitud con la proteína en <i>Pestalotiopsis fici</i> W106-1 unplaced genomic scaffold PFICI Scf... (21% de identidad)	Pc21g22650 Pc21g22770 Pc21g22790	
46	Otro		fuerte similitud con la proteína en <i>Penicillium expansum</i> strain CMP-1 contig927, w. g. (84% de identidad)	Pc22g06310 Pc22g06330 Pc22g06360	
47	t1PKS	Patulin	similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM164 genomic scaffold, ProqFM164505 (56% de identidad)	Pc22g08170	
48	Ácido graso		similitud con la proteína en <i>Penicillium digitatum</i> PH126 contig304, w. g.sh. (62% de identidad)	Pc22g09030	
49	Otro		similitud con la proteína en <i>Penicillium expansum</i> strain d1 contig218, w. g. sho... (42% de identidad)	Pc22g09430 Pc22g09460	

Figura C.4: antiSMASH4

Número	Tipo	Compuesto producido por la similitud del Cluster de genes	Función de la proteína putativa con mayor similitud	ORF correspondiente en <i>P. chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	Predicción de estructura
50	t1PKS		similitud con la proteína en <i>Penicillium expansum</i> strain d1. contig218, w.e.g. sho. (50% de identidad)	Pc22g09560 Pc22g09610 Pc22g09640	
51	NRPS		fuerte similitud con la proteína en <i>Penicillium roqueforti</i> FM164 genomic scaffold, ProqFM164501, w. (83% de identidad)	Pc22g20370 Pc22g20400 Pc22g20490 Pc22g20630	
52	t1PKS		similitud con la proteína en <i>Penicillium marneffei</i> ATCC 18224 scf 11056683-40960 genomic sca.(21% de identidad)	Pc22g23750 Pc22g23830	
53	Terpeno		similitud con la proteína en <i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 scf 1106286419476 genomic scaffold... (15% de identidad)	Pc22g24180 Pc22g24190	

Figura C.5: antiSMASH5